

Die circadiane Rhythmik der Sporenbildung
von *Neurospora crassa*:

**Untersuchungen zur Rolle des Energiestoffwechsels an
Rhythmik-(*frq1* und *frq 7*) und mit mitochondrialen (*poky*, C93) Mutanten**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

des Fachbereichs 2 Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von
Reinhard Schulz
aus Bielefeld

Referent: Prof. Dr. L. Rensing
Korreferent: Prof. Dr. L. H. Grimme

Bremen, im Mai 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543123_0007

Die circadiane Rhythmik der Sporenbildung
von *Neurospora crassa*:

**Untersuchungen zur Rolle des Energiestoffwechsels an
Rhythmik-(*frq1* und *frq 7*) und mitochondrialen (*poky*, C93) Mutanten**

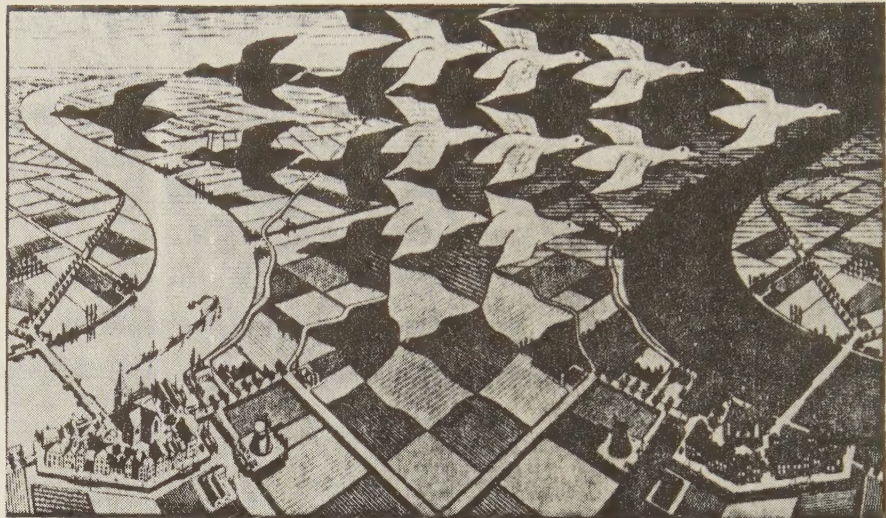
Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

des Fachbereichs 2 Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von
Reinhard Schulz
aus Bielefeld

Referent: Prof. Dr. L. Rensing
Korreferent: Prof. Dr. L. H. Grimme

Bremen, im Mai 1984



Die festgesetzten Bewegungen unseres Geistes, unsere gesetzmäßige Gymnastik (z.B. in Raum- und Zeitvorstellungen oder in dem Bedürfnis nach "Begründung") - dieser philosophische Habitus des menschlichen Geistes ist unsere eigentliche Potenz: also daß wir in vielen Dingen nicht mehr anders können: was man psychologische Notwendigkeit nennt. Diese ist geworden: - und zu glauben, unser Raum, unsre Zeit, unser Kausalitätsinstinkt, sei etwas, das auch abgesehen von Mensch und Tier Sinn habe, ist nachgerade eine Kinderei.

F. Nietzsche 1885

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1. Genetische Symbole	7
2.2. Verwendete Stämme	8
2.3. Medien	9
2.3.1. Salze und Spurenelemente	9
2.3.2. Biotin-Lösung für Standardmedium	11
2.3.3. Flüssige Medien	11
2.3.4. Feste Medien	11
2.4. Zubehör Flüssigkulturtechnik	13
2.5. Phasen-Response-Kurven	13
2.5.1. Aufnahme der Phasen-Response-Kurven (PRC)	13
2.5.2. Lösungsmittel und Bezugsquellen der verwendeten Hemmstoffe	16
2.6. Aufnahme der <u>in vivo</u> NMR-Spektren	16
2.7. Energy charge	18
2.7.1. Bestimmung des Energy charge	18
2.7.2. Puffer und Reaktionsgemische	19
2.8. ATPase-Aktivität	19
2.8.1.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität von Agarkulturen	19
2.8.1.2. Puffer und Reaktionsgemisch	21
2.8.2.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität von Flüssigkulturen	21
2.8.2.2. Puffer und Reaktionsgemische	22
3. Ergebnisse	24
3.1. Phasen-Response-Kurven	24
3.1.1. Phasenverschiebungen durch Vanadat und Molybdat	24
3.1.2. Phasenverschiebungen durch N-Ethylmaleimid, Azid, Cyanid und Oligomycin	27
3.1.3. Phasenverschiebungen durch DCCD und Licht im Wildtyp bd A im Vergleich mit der mitochondrialen Mutante bd poky A	28
3.1.4. Phasenverschiebungen durch Cycloheximid (CHX) im Wildtyp bd A im Vergleich mit der mitochondrialen Mutante bd poky A	30
3.2. <u>In vivo</u> ³¹ P-Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	30
3.2.1. ³¹ P-NMR-Spektren vom Wildtyp bd A im Vergleich zu den Rhythmusmutanten frq 1 A und frq 7 A	31

3.2.2.	^{31}P -NMR-Spektren vom Wildtyp bd A nach Pulsen von phasenverschiebenden Stoffwechsellinhibitoren	34
3.3.	Circadiane Rhythmik im Energycharge vom Wildtyp bd A	36
3.4.	Circadiane Unterschiede im ATP/ADP-Verhältnis der frq-Mutanten	38
3.5.	Circadiane Unterschiede der ATPase-Aktivität	39
3.5.1.	Konidienextrakte von bd csp-Agarkulturen	39
3.5.2.	Mycelienextrakte von bd A-Flüssigkulturen	41
3.5.3.	Mycelienextrakte von bd A-Flüssigkulturen nach Vanadathemmung	42
4.	Diskussion	44
4.1.	Methoden	44
4.2.	Phasen-Response-Kurven	45
4.2.1.	Wirkung der Hemmstoffe	45
4.2.2.	Ergebnisse anderer Autoren	48
4.2.3.	Nichtrhythmische Veränderungen	48
4.2.4.	Schlußfolgerungen	51
4.3.	Rhythmische Veränderungen	53
4.3.1.	Energycharge und ATPasen	53
4.3.2.	Vergleich mit ^{31}P -NMR-Spektren und Literaturbefunden	54
4.3.3.	Schlußfolgerungen	56
5.	Modell	58
6.	Zusammenfassung	60
	Literaturverzeichnis	62

1. Einleitung

Circadiane Rhythmen kommen in nahezu allen Eukaryonten vor (Bünning 1977), aber über den molekularen Mechanismus ist vergleichsweise wenig bekannt (Rensing, Schulz 1984). Phasenverschiebungen der Rhythmik durch pulsformige Zugabe bestimmter Agenzien werden als Indikatoren für veränderte rhythmische Primärprozesse betrachtet. Pulsförmige Störungen der circadianen Rhythmik mit Hemmstoffen des Energiestoffwechsels verschieben bei mehreren daraufhin untersuchten Organismen die Phase in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration und dem Zeitpunkt der Pulsgabe (Zusammenfassung: Cornelius, Rensing 1982). Die Folgerungen, welcher der in Frage kommenden Prozesse verändert wurde, sind bisher meist widersprüchlich und müssen durch direkte Messung biochemischer Parameter ergänzt werden.

Während eine Anzahl von Daten für die phasenverschiebende Wirkung von Stoffwechselinhibitoren vorliegen (Bünning et.al. 1965, Bünning, Moser 1972, Van Steveninck 1976, Eskin, Corrent 1977, Schrempf 1980, Mayer 1981, Eskin 1982, Eckhardt 1982, Nakashima 1981, 1982, 1984), ist auf der anderen Seite die Frage der Beteiligung des Energiestoffwechsels an der circadianen Rhythmik umstritten. Mögliche Gründe hierfür sind:

1. Widersprüchliche Ergebnisse mit dem gleichen Hemmstoff bei verschiedenen Organismen
2. Widersprüchliche Ergebnisse an einem Organismus
3. Eine relativ weit von den Primärwirkungen entfernt liegende Wirkung auf den Oszillator.

Die Konzentration auf ein besonders geeignetes Untersuchungsobjekt ist daher wünschenswert. Neurospora crassa ist einer der genetisch (Perkins 1977) und biochemisch (Alberghina, Sturani 1981) am besten charakterisierten Eukaryonten mit einer Vielzahl von Frequenzmutanten (Zusammenfassung: Feldman et. al. 1979,

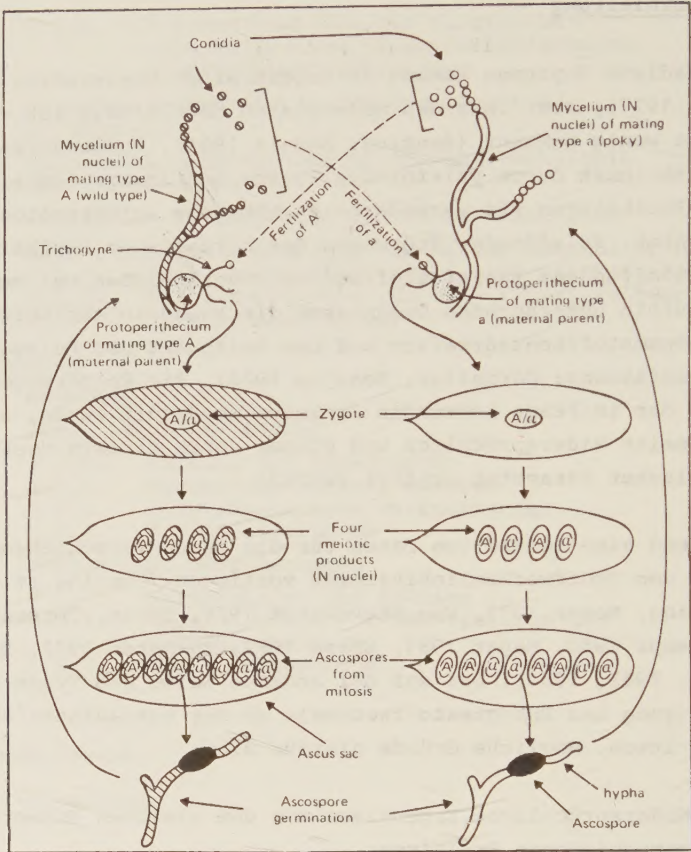


Abb. 1 Der Lebenszyklus von *Neurospora crassa*, der auch die Vererbung der in dieser Arbeit verwendeten mitochondrialen poky-Mutante zeigt. Haploide Mycelien bilden vegetativ Konidien (Macro- und Mikrokonidien), die weitere haploide Mycelien auskeimen. Beim sexuellen Zyklus werden zwei Kreuzungstypen (A und a) benötigt. Bei der Befruchtung wandern Zellkerne von Konidien oder Mycelien in ein Protoperithecium des entgegengesetzten Kreuzungstyps durch die Trichogynen. Die Fusion, die Meiose und die Sporenbildung finden im Protoperithecium statt. Die Abbildung zeigt den mütterlichen Erbgang von poky. Beim Wildtyp haben alle 8 Ascosporen einen Wildtyp-Phänotyp, bei poky haben alle 8 einen poky-Phänotyp. Die nuclearen Kreuzungstyp-Allele segregieren nach Mendelschen Gesetzen (nach Gillham 1978).

Feldman, Dunlap 1983). Perlman et. al. (1981) haben für Neurospora crassa eine Flüssigkulturtechnik beschrieben, die es erlaubt, die circadiane Rhythmik unabhängig von Differenzierungsvorgängen (Konidienbildung) zu untersuchen. Der normale Lebenszyklus von Neurospora crassa (Abb. 1) verdeutlicht diesen Zusammenhang. Durch Reduzierung des Kohlenstoffangebots im Flüssigmedium kann die Konidienbildung (Abb. oben) vorübergehend bis zur Ausbildung eines dichten Myceliums unterdrückt werden. In dieser Zeit läuft die circadiane Rhythmik normal weiter (Perlman et. al. 1981) und es können daher sämtliche Untersuchungen der Rhythmik in Flüssigkultur (Hemmstoffpulse, radioaktiver Einbau, biochemische Extraktionen etc.) ohne überlagernde Differenzierungsvorgänge vorgenommen werden.

Alle in der Vergangenheit beschriebenen tagesperiodischen Veränderungen des Energiestoffwechsels (Enzymaktivitäten, Energy-charge, Pyridinnucleotidgehalte, Zusammenfassung: Feldman, Dunlap 1983) wurden an Mycelien-Konidien-Mischkulturen gewonnen, was auf Grund der circadianen Konidienbildung problematisch ist. Messungen der CO₂-Abgabe unter Minimalbedingungen in Flüssigkultur sind dagegen nicht rhythmisch (Nakashima 1981).

In dieser Arbeit steht daher die Frage nach dem Zusammenhang von pulsformigen Störungen und den davon betroffenen biochemischen Prozessen im Vordergrund. Bis auf eine Ausnahme wurden sämtliche Untersuchungen in Flüssigkultur durchgeführt. Die Vergleichbarkeit der Daten ist dadurch gesichert.

Für den molekularen Mechanismus der circadianen Rhythmik ist bis heute kein Genprodukt identifiziert. Hinweise auf die Untereinheit 9 der mitochondrialen ATP-Synthetase (Dieckmann, Brody 1980) auf Grund der periodenverkürzenden Wirkung von Mutationen im Kerngen dieser Untereinheit liegen vor. Analysen der Aminosäurezusammensetzung in dieser Untereinheit in Frequenzmutanten führten aber bisher zu keinem Ergebnis (Brody, persönliche Mitteilung).

Zur Charakterisierung der Rolle des Energiestoffwechsels für die Rhythmik werden daher Frequenzmutanten mit veränderter Perioden-

länge (frq1A, frq7A) und Mutanten des mitochondrialen Energiestoffwechsels (poky, C93) verwendet.

Die Abbildung 1 illustriert den Verlauf in den Erbgängen der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten: Während die chromosomalen Mutanten (bd, csp, frq) nach Mendelschen Gesetzen vererbt werden, haben die extrachromosomalen mitochondrialen Mutanten (poky, C93) einen mütterlichen Erbgang.

Neben den Mitochondrien ist die Plasmamembran von besonderem Interesse, da spezifische Hemmstoffe dieser Membran die Neurospora-"Uhr" beeinflussen (Nakashima 1981, Feldman, Dunlap 1933). ATPase-Mutanten der Plasmamembran stehen nicht zur Verfügung, da vanadatresistente Mutanten (Bowman et. al. 1983) lediglich defekt im Phosphattransport sind. Verwendete Hemmstoffe sind Vanadat, Molybdat, N-Ethylmaleimid (NEM), Oligomycin und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), um deren phasenverschiebende Eigenschaften sowie Unterschiede bzw. Übereinstimmungen ihrer Phasen-Response-Kurven (Abb. 2) zu untersuchen. Die bereits von

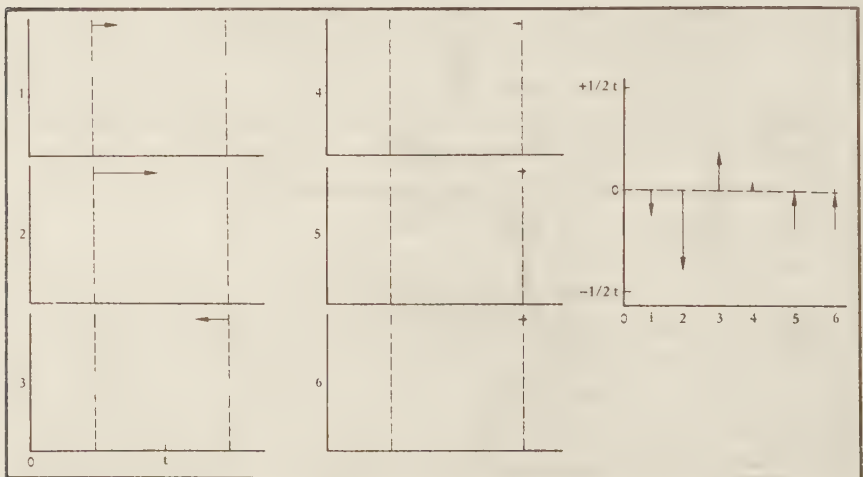


Abb. 2 Darstellung von 6 phasenabhängigen Störungen (Unterbrechung der Kurve) einer Schwingungsperiode (0 - t). Die Länge der Pfeile gibt das Ausmaß der Phasenverschiebung (gemessen an den Maxima der Schwingung) gegenüber einer ungestörten Kontrollschwingung (gestrichelte Linie) an. Verzögerungen werden als negative, Verfrühung als positive Phasenverschiebung bezeichnet. Die Auftragung dieser Phasenverschiebungen gegen die Periode wird in Form einer sogenannten Phasenresponsekurve (rechts) dargestellt.

Nakashima untersuchte phasenverschiebende Wirkung von Cyanid (NaCN), Azid (NaN_3) und Licht (persönliche Mitteilung) wird wiederholt, um deren Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit den übrigen Hemmstoffen zu sichern.

Die Wirkung der Hemmstoffpulse wird mit gleicher Konzentration und Dauer außerdem mit Hilfe der ^{31}P -Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie in vivo überprüft und mit den Phasen-Response-Kurven verglichen. Dabei wird besonders nach einem Parameter gesucht, der sich bei Substanzen, die gleiche Phasen-Response-Kurven erzeugen, in gleicher Weise ändert.

Wenn der Energiestoffwechsel direkt als Element des Oszillators fungiert, müßten sich rhythmische Änderungen im zellulären Gesamtstoffwechsel oder den Zellkompartimenten zeigen. Das von Atkinson vorgestellte Energycharge-Konzept (1968, 1977) könnte bei der Suche nach rhythmischen Parametern nützlich sein, da der circadiane Oszillator möglicherweise Netzwerkcharakter hat und da mit dem Regulationskonzept von Atkinson ein experimentell überprüfbares Modell vorliegt. Durch in vitro-Messungen der Adenin-nucleotidgehalte über zwei circadiane Zyklen sollen daher die NMR-Ergebnisse und die Kopplung des Energycharge an den circadianen Oszillator überprüft werden. Anschließend soll nach einem Schnellextraktionsverfahren die Gesamt-ATPaseaktivität von Agar- und Flüssigkulturen bei verschiedenen pH-Werten und nach Hemmstoffzugabe als Funktion der Zeit ermittelt werden. Bei allen in vitro-Versuchen werden die Frequenzmutanten mit dem Wildtyp verglichen. Möglicherweise konvergieren die Wirkungen der Störpulse auf Phosphorylierungs/Dephosphorylierungs-Reaktionen und/oder Protonenaustausche in bestimmten Phasen des circadianen Rhythmus hin.

Hinweise über die Bedeutung der Mitochondrien für den circadianen Rhythmus wurden von der mitochondrialen Mutante "poky" (Lambowitz et. al. 1976) erwartet. Das rhythmische Verhalten dieser Mutante ist normal bei reduzierter Wachstumsgeschwindigkeit. Die Notwendigkeit der Mitochondrien für den circadianen Oszillator

ist daher fragwürdig. Die geringere Licht- und DCCD-Empfindlichkeit von "poky" gegenüber dem Wildtyp könnte an der veränderten Zusammensetzung der Plasmamembran und deren engere Kopplung an den circadianen Oszillator liegen.

2. Material und Methoden

2.1. Genetische Symbole

- bd: Chromosomale morphologische Mutation mit einer circadianen Rhythmik der vegetativen Sporen-(Konidien)-bildung auf Agar. Die CO₂-Empfindlichkeit der Konidienbildung im Wildtyp ist im Phänotyp dieser Mutante defekt (Sargent et. al. 1966). Die Mutante wurde aus dem Wildtypstamm 74A isoliert.
- frq: Chromosomale Frequenzmutation mit veränderter Periodenlänge der circadianen Sporenbildung, die im bd-Stamm isoliert wurde (Zusammenfassung: Feldman et. al. 1979). Zur Vereinfachung der Terminologie wird im folgenden bei den Untersuchungen der circadianen Rhythmik die bd-Mutante als Wildtyp und die frq-Doppelmutante als Mutante bezeichnet.
- csp: Chromosomale Mutation, die die Trennung der Konidien von den Mycelien verhindert (Selitrennikoff et. al. 1974). Brody und Mitarbeiter haben für den offenen Gebrauch von Agarkulturen zur biochemischen Untersuchung der circadianen Rhythmik diese Mutation in den bd-Stamm gekreuzt (Mattern et. al. 1982).
- poky: Extrachromosomale atmungsdefiziente Mutation mit reduziertem Cytochrom aa₃- und Cytochrom b-Gehalt (Mitchell, Mitchell 1952, Tissieres et. al. 1953), der auf der Veränderung der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen beruht (Lambowitz et. al. 1976).
- C 93: Extrachromosomale temperatursensitive Mutante mit reduziertem Cytochrom aa₃- und Cytochrom b-Gehalt bei 37° C (Pittenger, West 1979), der auf dem defekten Assembly des mitochondrialen ATPase-Komplexes beruht (Collins et. al. 1981).

A: Alle verwendeten Stämme sind vom A-Kreuzungstyp und haploid.

2.2. Verwendete Stämme

- bd A: Der Stamm bd A trägt die chromosomale band (BD) Mutation. Unter freilaufenden Bedingungen (in Dauerdunkel) beträgt die Periodenlänge (Abstand zwischen zwei Konidienbändern) der circadianen Rhythmik 21.5 Stunden.
- bd csp A: Der Stamm bd csp A trägt zwei chromosomale Mutationen (bd und csp). Die Periodenlänge der circadianen Rhythmik entspricht der von bd A.
- frq 1A: Die Frequenzmutante 1 wurde zuerst als circadiane Rhythmusmutante isoliert (Feldman, Hoyle 1973) und hat eine freilaufende Periodenlänge von 16.5 Stunden. Bisher ist dies die Mutante mit der kürzesten Periodenlänge, die im bd-Stamm isoliert wurde.
- frq 7A: Die Frequenzmutante 7 hat eine freilaufende Periodenlänge von 29 Stunden und ist damit die Mutante mit der längsten Periodenlänge unter Standardbedingungen. Die beiden hier verwendeten Frequenzmutanten kartieren am gleichen Genort.
- bd poky A: Der Stamm bd poky A trägt die chromosomale bd-Mutation und die extrachromosomale poky-Mutation.
- C 93 A: Der Stamm C 93 A ist temperatursensitiv und trägt die extrachromosomale C 93 Mutation, die bei 37° C exprimiert wird. Bei 25° C hat dieser Stamm einen normalen mitochondrialen Phänotyp.

2.3. Medien

2.3.1. Salze und Spurenelemente

Salze und Spurenelemente werden schrittweise vollständig gelöst, mit Chloroform (2 ml/l) versetzt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2.3.1.1. Zusammensetzung des Vollmedium-Salzes (5x)

Kaliumtartrat	25 g/l
Natriumnitrat	20 g/l
KH_2PO_4	5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.5 g/l
NaCl	0.5 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l

2.3.1.2. Zusammensetzung des Vogels-Salzes (50x)

(Vogel, H.J. 1956 Microbiol. Gen. Bull. B.: 42 - 43)

$\text{Na}_3\text{-citrat} \cdot 5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} (2 \text{H}_2\text{O})$	150 g (125 g in 775 ml H_2O)
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	250 g / 750 ml
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	100 g / 750 ml
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 g / 750 ml
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5 g / 750 ml
Spurenelemente	5 ml
Biotinlösung (0.1 mg/ml)	2.5 ml

auf 1 l auffüllen und pH 5.8 überprüfen.

2.3.1.3. Zusammensetzung des Fries-Salzes (5x)

NH_4 tartrat	25 g/l
NH_4 nitrat	5 g/l
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	5 g/l
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.5 g/l
NaCl	0.5 g/l
CaCl_2	0.5 g/l
Spurenelemente	0.5 ml/l

2.3.1.4. Zusammensetzung des phosphatfreien Fries-Salzes (5x)

NH_4 tartrat	25 g/l
NH_4 nitrat	5 g/l
KCl	13.7 g/l
o-Phosphoryläthanolamin	0.1411 g/l
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.5 g/l
NaCl	0.5 g/l
CaCl_2	0.5 g/l
Spurenelemente	0.5 ml/l

2.3.1.5. Zusammensetzung der Spurenelemente

Zitronensäure $\cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g / 95 ml
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5 g / 95 ml
$\text{Fe (NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g / 95 ml
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.25 g / 95 ml
$\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05 g / 95 ml
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	0.05 g / 95 ml
$\text{Na}_2 \text{Mo O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g / 95 ml
entspricht 100 ml Gesamtvolumen.	

2.3.2. Biotin-Lösung für Standardmedium

Biotin wird in 50 % Äthanol gelöst: 0,1 mg/ml und bei -15° C bis +5° C aufbewahrt.

2.3.3. Flüssige Medien

Sämtliche flüssigen und festen Medien werden 20 Minuten bei 120° C autoklaviert.

2.3.3.1. Glucose-Arginin-Medium

Glucose	3 g / 800 ml
Arginin	5 g / 800 ml
Biotin (0.1 mg/ml)	1 ml / 800 ml
Fries-Salz	200 ml / 800 ml
entspricht 1 l Gesamtvolumen.	

2.3.3.2. Glucose-Arginin-Minimalmedium

Glucose	0.3 g / 800 ml
Arginin	0.5 g / 800 ml
Biotin (0.1 mg/ml)	1 ml / 800 ml
Fries-Salz	200 ml / 800 ml
entspricht 1 l Gesamtvolumen.	

2.3.4. Feste Medien

2.3.4.1. Horowitz Vollmedium (Ryan 1950, Methods in Medical Research 3: 51 - 75)

Vollmediumsalz (5x)	20 ml / 80 ml
Glycerin	1.6 ml / 80 ml

Caseinhydrolysat (5 %)	0.5 ml / 80 ml
Hefeextrakt	0.5 g / 80 ml
Malzextrakt	0.5 g / 80 ml
Agar	1.5 g / 80 ml

Den Agar auf der Heizplatte mit Rührer vollständig lösen, 6 ml Medium in große Reagenzgläser füllen, mit Watte verschließen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren heiße Reagenzgläser sofort schrägstellen und abkühlen lassen.

2.3.4.2. Glucose-Arginin-Medium

Glucose	1.5 g / 800 ml
Arginin	2.5 g / 800 ml
Biotin (0.1 mg/ml)	1 ml / 800 ml
Fries-Salz	200 ml / 800 ml
Agar	15 g / 800 ml

Den Agar auf der Heizplatte mit Rührer vollständig lösen, 12 ml Medium in Glasröhren (Race tubes) füllen, beide Seiten der Röhre mit Watte verschließen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren das Kondenswasser mit heißem Medium abschwenken und das Medium austarieren.

2.3.4.3. Maltosemedium

Maltose	5 g / 980 ml
Inositol	0.1 g / 980 ml
Arginin	0.1 g / 980 ml
Vogels Salz	20 ml / 980 ml
Agar	20 g / 980 ml

entspricht 1 l Gesamtvolumen.

Nach dem Autoklavieren große sterile Petrischalen mit heißem Medium füllen, bis der Boden vollständig bedeckt ist und eine Stunde später das Kondenswasser vom Deckel abschütteln.

2.4. Zubehör Flüssigkulturtechnik

2.4.1. Konidienfilter

Kleinen Glastrichter in Reagenzglas stecken und mit Watte abdichten. Innenseite des Glastrichters mit Glaswolle auslegen und das Ganze mit Stanniolpapier abdichten und zusammen mit destilliertem Wasser in einem Extragefäß autoklavieren.

2.4.2. Glasstäbe

Für alle Manipulationen 10 cm Glasstäbe autoklavieren.

2.5. Phasen-Response-Kurven

2.5.1. Aufnahme der Phasen-Response-Kurven (PRC)

Für diese Experimente wurden die Stämme bd A und bd poky A aus J. F. Feldmans Labor verwendet. Die Stammkulturen wachsen auf Horowitz Vollmedium (Davis, de Serres 1970) in Schrägagarröhrchen bei Dauerlicht oder im Hell-Dunkel-Wechsel innerhalb einer Woche. Das Wachstum der bd poky A Mutante ist gegenüber dem Wildtyp verlangsamt. Die zur Vorbereitung der Experimente verwendete Flüssigkulturmethode entspricht der von Perlman (Perlman et. al. 1981) eingeführten und von Nakashima (Nakashima 1981) veränderten Vorschrift mit der Einschränkung, daß die Kulturen im Dauerdunkel nicht geschüttelt wurden.

Im einzelnen werden die Konidien der einwöchigen Stammkultur in 5 ml sterilem, destilliertem Wasser auf einem Vortex-Schüttler suspendiert und danach durch sterile Glaswolle gefiltert. Dabei werden die Konidien von den Mycelien, die in der Glaswolle hängenbleiben, getrennt. Mit einer kleinen Menge der Konidiensus-

pension (0.1 - 0.3 ml), was etwa $1 - 3 \times 10^6$ Konidien entspricht, werden Petrischalen, die 25 ml Flüssigmedium enthalten, beimpft. Das Medium enthält Fries Salz (Fries 1948), 0,3 % Glucose und 0,5 % Arginin. Bei 25° C und konstantem Licht wächst in diesem Medium in ca. 36 Stunden ein dichtes Mycelium. Mit einem Korkbohrer (11 mm Durchmesser) werden aus diesem Mycelium kleine Bereiche steril ausgeschnitten. Der Korkbohrer wird deshalb von Zeit zu Zeit mit Ethanol abgeflammt. Jeweils 6 - 7 dieser kleinen Mycelienausschnitte werden in Petrischalen mit 25 ml frischem Flüssigmedium übertragen. Dieses Medium enthält Fries Salz und nur noch 0.03 % Glucose und 0.05 % Arginin, um Wachstum und Differenzierung (Konidienbildung) zu verhindern. Diese stationären Kulturen werden bei 25° C im Dauerdunkel gehalten. Durch den Übergang vom Dauerlicht ins Dauerdunkel wird der circadiane Oszillator in Gang gesetzt und dieser Zeitpunkt wird daher als circadiane Zeit 12 (CT12) definiert. Alle weiteren Manipulationen können von nun an unter Rotlicht durchgeführt werden, da Neurospora crassa keinen Rotlichtrezeptor besitzt. Zu verschiedenen Zeiten im Dauerdunkel werden Hemmstoffpulse von 3 Stunden oder Lichtpulse von 5 Minuten gegeben. Danach werden die Mycelien in frischem hemmstofffreien Medium genauso wie eine unbehandelte Kontrolle gewaschen und in lange, sterile Glasröhren mit 12.5 ml festem Agar übertragen. Dieses Medium enthält Fries Salz, 0.15 % Glucose, 0.25 % Arginin und 1.5 % Agar. Je nach Temperatur und Medienzusammensetzung wachsen die Kulturen in ca. einer Woche durch die Glasröhren (Abb. 3). Um die Phasenlage und die Periodenlänge des circadianen Rhythmus ermitteln zu können, muß jeden Tag zur gleichen Zeit im Dauerdunkel bei Rotlicht die Wachstumsfront auf den Glasröhren markiert werden.

Für die Ermittlung der Phasen-Response-Kurven wird der Mittelwert von jeweils sechs Glasröhren sowohl für die gehemmten Proben wie für die unbehandelten Kontrollen gebildet. Die Phasenlage und die Periodenlänge der circadianen Sporulationsrhythmik jeder einzelnen Glasröhre wird unter Verwendung eines Apple II Computers und eines Graphiktablets mit Hilfe einer veränderten (Taylor 1982 und Gooch 1983, beide persönliche Mitteilung) line-

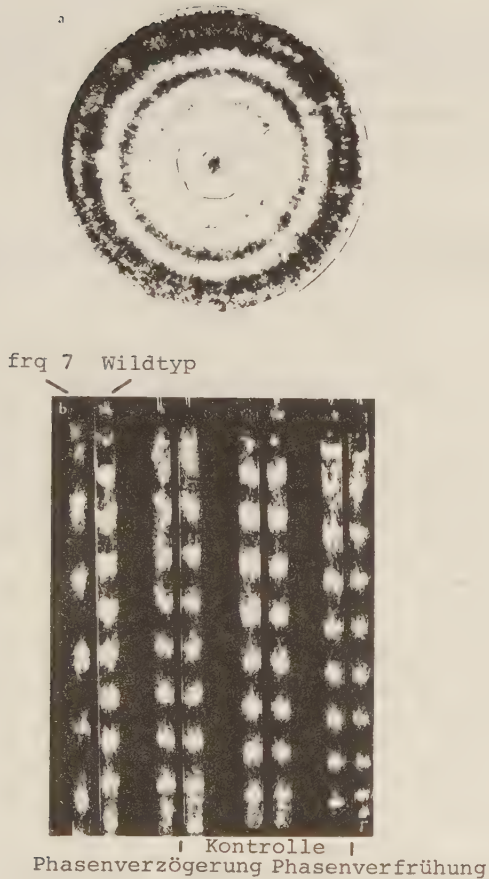


Abb. 3 Sporulationsrhythmik von Neurospora crassa: (a) Ringförmiges Sporulationsmuster, das nach Animpfen einer Neurospora-Kultur auf Agar in der Mitte einer Petri-schale unter konstanten Bedingungen (Dauerdunkel) entsteht. (b) Links außen: in Glasröhren auf Agar gewachsene langperiodische Mutante (frq 7:29 h) im Vergleich mit dem Wildtyp (21 h) (Wachstumsbeginn: oberer Bildrand). Links innen bis rechts außen: Ergebnisse eines Phasen-responsekurvenexperiments nach vorheriger puls-förmiger Störung der Sporulationsrhythmik mit Vanadat (Na_3VO_4), einem Hemmstoff der Plasmamembran-ATPase von Neurospora crassa. Links innen: 2 Glasröhren mit Phasenverzögerungen, rechts innen: 2 unbehandelte Kontrollen, rechts außen: 2 Glasröhren mit Phasenverfrühungen.

aren Regressionsanalyse (Dharmananda, Feldman 1979) ermittelt. Bei der Berechnung der Phasenverschiebungen ist davon auszugehen, daß die circadiane Periodenlänge in Flüssigkultur und auf Agar identisch ist. Ebenso wird die "Uhr" durch den Übergang von der Flüssigkultur auf Agar nicht beeinflusst (Perlman et. al. 1981).

2.5.2. Lösungsmittel und Bezugsquellen der verwendeten Hemmstoffe

	Lösungsmittel ¹⁾	Bezugsquelle
Azid (Na N_3)	H_2O	Merck
Cyanid (NaCN)	H_2O	Merck
Cycloheximid (CHX)	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)	DMSO	Sigma
Molybdat ($\text{Na}_2 \text{Mo O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	H_2O	Merck
N-Ethylmaleimid (NEM)	DMSO	Sigma
Oligomycin	DMSO	Boehringer
Vanadat ($\text{Na}_3 \text{VO}_4$)	H_2O	Aldrich

- 1) Das Lösungsmittel (H_2O oder DMSO) wird den Kontrollen jeweils in der den Hemmstoffpulsen entsprechenden Menge zugesetzt. Der Rhythmus bleibt dabei unverändert.

2.6. Aufnahme der in vivo NMR-Spektren

Für diese Experimente wurden neben dem Wildtyp bda die Frequenzmutanten frq 1A und frq 7A, die von J. F. Feldman und Mitarbeitern isoliert wurden, benutzt. Die Stämme wurden zur Aufnahme der ^{31}P -NMR-Spektren genauso vorbereitet wie für die Aufnahme der Phasen-Response-Kurven, um die möglicherweise in vivo beob-

achtbaren zeitlichen Veränderungen des Phosphatstoffwechsels mit den spezifisch auf diesen Stoffwechsel einwirkenden Hemmstoffen, die die Phasenlage der circadianen Rhythmik verschieben, korrelieren zu können. Die Mutanten wurden verwendet, um zu überprüfen, ob zeitliche Konzentrationsunterschiede von der Periodenlänge der circadianen Rhythmik abhängig sind.

Da auch hier die Mycelien unter stationären Hungerbedingungen untersucht wurden und diese Methodik auf Grund ihrer vergleichsweise geringen Empfindlichkeit im Millimolarbereich stark konzentriertes Untersuchungsmaterial erfordert, wurde der Gesamteinhalt von zwei Petrischalen pro Versuchsansatz verwendet. Zunächst wurden die beiden Mycelien mit einer Pasteurpipette der Länge nach vorsichtig übereinander gerollt und sofort in ein mit Medium gefülltes 15 mm NMR-Röhrchen überführt. Um die Mycelien von außen noch ausreichend mit Medium versorgen oder mit Hemmstoffpulsen behandeln zu können, ist eine noch stärkere Konzentrierung nicht mehr möglich.

Während der spektroskopischen Analyse befindet sich das NMR-Röhrchen im Dauerdunkel und wird während des Versuchs über eine Schlauchpumpe mit 5 ml Medium pro Minute durchspült. Bei Langzeitmessungen von 16 - 24 Stunden werden die Mycelien mit 500 ml externem, 0.03 %igem Glucosemedium versorgt,

Die Hemmstoffpulse werden mit der gleichen Dauer und Konzentration gegeben, bei der auch die Phasenverschiebungen der Sporulationsrhythmik erzielt wurden.

Die Messungen wurden mit einem Bruker WH 360 NMR Spektrometer durchgeführt. Die Meßfrequenz für ^{31}P -Kerne beträgt bei diesem Gerät 145 MHz.

2.7. Energy charge

2.7.1. Bestimmung des Energy charge

Der Adenylat Energy Charge (AEC) ist ein Maß für die Stoffwechselenergie, die in der Gesamtheit der Adeninnucleotide enthalten ist (Atkinson 1968, 1977). Der AEC ist definiert als das Verhältnis der adenylierten Phosphate:

$$\text{AEC} = \frac{\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

Für die Bestimmung der Adeninnucleotidgehalte wurden die Stämme genauso wie für die Phasen-Response-Kurven-Experimente vorbereitet. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit des für diese Messungen verwendeten LUMAC Biocounters 2010 wurde im Unterschied zu den NMR-Untersuchungen bedeutend weniger Zellmaterial benötigt.

Für jede Bestimmung wurden mit dem Korkbohrer 10 Scheiben (11 mm Durchmesser) aus dem Mycelium in Flüssigkultur ausgeschnitten. Zu verschiedenen Zeiten im Dauerdunkel unter Rotlicht wurden parallele Ansätze in 4,5 ml kochendem Tris-EDTA-Puffer (pH 7.75) in einem 25 ml Erlenmeyerkolben 3 Minuten gekocht. Um die Verdampfung zu verringern, wurden die Kölbchen mit einem Uhrenglas abgedeckt. Anschließend wurden die Proben im Eisbad abgekühlt und das Flüssigkeitsvolumen wurde auf 5 ml mit destilliertem Wasser eingestellt.

Der ATP-Gehalt läßt sich direkt ermitteln. Um das ADP und das AMP bestimmen zu können, müssen diese Nucleotide zunächst enzymatisch in äquivalente Mengen ATP umgesetzt werden. In einem Hepes-Puffer (pH 7.75) wird das ADP mit einer Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat als Substrat in ATP umgesetzt und das AMP wird mit einer Myokinase zunächst in ADP und dann entsprechend in ATP umgewandelt. Die enzymatische Umsetzung erfolgt für alle Ansätze über 30 Minuten bei 30⁰ C im Wärmeschrank. Die Reaktion wird in

Eis gestoppt. Der ATP-Gehalt wird im Biocounter bei Zimmertemperatur durch sofortigen Zusatz eines Luciferin-Luciferase-Gemisches über ein Zeitintervall von 10 sec. mit einem hochempfindlichen Photomultiplier bestimmt. Zur Bestimmung des Trockengewichts werden die gekochten Mycelien über Nacht bei 80° C im Trockenschrank getrocknet.

2.7.2. Puffer und Reaktionsgemische

2.7.2.1. Extraktionspuffer (pH 7.75)

50 mM Tris

4 mM EDTA

2.7.2.2. Reaktionsgemisch (pH 7.75)

25 mM Hepes

10 mM KCL

für die ADP-Bestimmung:

+ Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase

für die AMP-Bestimmung:

+ Myokinase in 3.2 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

Das Luciferin-Luciferase-Gemisch ist in 25 mM Hepes (pH 7.75) gelöst.

2.8. ATPase-Aktivität

2.8.1.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität von Agarkulturen

Nur für diese Experimente wurde der Stamm bd csp aus Brodys Labor verwendet, da die biochemischen Untersuchungen sowohl an Mycelien

wie auch an Konidien durchgeführt wurden. Die *csp*-Mutation gewährleistet, daß sich die Konidien nicht von den Mycelien ablösen. Im Unterschied zur Flüssigkulturmethode werden zu Versuchsbeginn einige Konidien direkt aus den Schrägagarröhrchen in den Petrischalen angeimpft. Die Platten werden über Nacht im Dauerlicht gehalten und dann ins Dauerdunkel (Ingangsetzen der Rhythmik) überführt.

Für die Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von der sichtbaren circadianen Rhythmik auf den Agarplatten wird ein Zellextrakt hergestellt. Die Konidien und Mycelien wachsen in großen Petrischalen (150 mm Durchmesser) durch steril überschichtetes Dialysefilterpapier hindurch. Von einer markierten Region, 2 Tage hinter der Wachstumsfront, wird mit einem breiten Spatel der Inhalt von 3 - 5 Petrischalen für jeden Meßzeitpunkt im Dauerdunkel unter Rotlicht abgehoben und sofort auf Trockeneis gefroren. Nach der Bestimmung des Frischgewichts wird in vorbereiteten eiskalten Mörsern nach Zusatz einer äquivalenten Menge von Extraktionspuffer (pH 7.2) und 2 Äquivalenten gewaschenem Quarzsand in 3 Minuten das Homogenat hergestellt. Dieses Homogenat wird 5 Minuten bei $1000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand wird als Extrakt für die Gesamt-ATPase-Aktivitätsmessung (Edwards, Unger 1978) und die Proteinbestimmung (Lowry et. al. 1951) verwendet.

Die ATPaseaktivität wird in einer 1 ml Quarzküvette in 0.98 ml Reaktionsgemisch, das auf $30^{\circ}C$ erwärmt wird, bestimmt. 5 - 25 μl des Extraktes werden zugesetzt und 5 Minuten vorinkubiert. Durch Zusatz von 2 μmol ATP (pH 7) wird die Reaktion gestartet. Die zeitliche Abnahme des NADH ist ein Maß für die äquimolare Menge ADP, die aus ATP gebildet wird und kann bei 340 nm (Redox = $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Edwards, Unger 1978) im Photometer verfolgt werden.

Für die Proteinbestimmung wird Rinderserumalbumin als Standard verwendet.

2.8.1.2. Puffer und Reaktionsgemisch

2.8.1.2.1. Extraktionspuffer (pH 7.2)

0.25 M Sucrose
1 m M EDTA
10 m M Tris-Acetat

2.8.1.2.2. Reaktionsgemisch (pH 7.5)

25 μ mol Tris-Acetat
25 μ mol Kalium-Acetat
300 μ mol Sucrose
2 μ mol Magnesiumchlorid
0.4 μ mol NADH
1 μ mol Phosphoenolpyruvat
2.8 Einheiten Lactatdehydrogenase
3 Einheiten Pyruvatkinase

Die Reaktion wird mit 2 μ mol ATP (pH 7) gestartet.

2.8.2.1. Bestimmung der ATPase-Aktivität von Flüssigkulturen

Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität werden die Stämme genauso wie für die Phasen-Response-Kurven-Experimente vorbereitet. Für die Herstellung des Extrakts werden die Flüssigkulturen genauso wie Agarkulturen behandelt, Zur Ermittlung der ATPase-Aktivität wird im Unterschied zu den Agarkulturen nicht die NADH-Abnahme, sondern die Freisetzung des anorganischen Phosphats (Bowman et. al. 1978) in 0,5 ml Reaktionsgemisch gemessen (Proteinbestimmung entsprechend 2.7.1.1.).

2.8.2.2. Puffer und Reaktionsgemische

2.8.2.2.1. Extraktionspuffer

wie 2.8.1.2.1.

oder

1 mM Phosphatpuffer (pH 7)

2.8.2.2.2. Reaktionsgemisch ATPaseaktivität

5 mM Na_2 ATP

5 mM Magnesiumchlorid

5 mM Phosphoenolpyruvat

0.5 mM EDTA

5 mM Azid (um die mitochondriale Restaktivität zu hemmen)

10 mM Tris / Pipes Puffer pH 6.7

Die Reaktion wird durch Zusatz von 25 μg Pyruvatkinase gestartet und nach 10 Minuten durch den Zusatz von 100 μl 50 %iger Trichloressigsäure gestoppt. Die Proben werden dann 5 min. bei 2000 x g zentrifugiert und das anorganische Phosphat wird im Überstand nach der Methode von Dreyer et. al. gemessen:

2.8.2.2.3. Reaktionsgemisch Phosphatgehalt

2.8.2.2.3.1. Standard (0.5 ml)

8.3 % Trichloressigsäure

1 μmol $\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

2.8.2.2.3.2. Reaktionsgemisch

0.5 ml Probe aus Überstand

2.5 ml 10 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

2 ml Semidin (500 mg in 10 g/l Na-bi-Sulfit lösen)

Mischen und nach 20 Minuten die Extinktion bei 710 nm bestimmen.

3. Ergebnisse

3.1. Phasen-Response-Kurven

3.1.1. Phasenverschiebungen durch Vanadat und Molybdat

Vanadat hemmt Reaktionen, an denen Phosphatgruppen beteiligt sind (Simons 1979). Das am besten untersuchte Beispiel ist die Plasmamembran-ATPase von Neurospora crassa (Bowman et. al. 1978, 1981). Molybdat hemmt die saure Phosphatase (Leigh und Walker 1980), die auch durch hohe Konzentrationen von Vanadat gehemmt wird.

Die circadiane Rhythmik von Neurospora crassa wird durch die Überführung der Mycelien in Flüssigkultur vom Dauerlicht in Dauerdunkel in Gang gesetzt. 24 Stunden später werden diese Kulturen mit einem 3stündigen Vanadatpuls behandelt. Danach werden sie mit phosphatfreiem Medium gewaschen und in Glasröhren mit dem gleichen Medium und pH, aber einer höheren Glucosekonzentration (0,15 % statt 0,03 %) gebracht, um die auf Agar sichtbare Konidienbildung in Gang zu setzen. Über einen Zeitraum von 24 Stunden werden wiederholt alle 3 Stunden weitere Vanadatpulse gegeben, wobei für jede Phase neue Kulturen verwendet werden. Die Phasenlage der circadianen Rhythmik einer Versuchsreihe über 24 Stunden wird mit einer Kontrollserie verglichen, die nicht mit Vanadat gehemmt wurde (Abb. 4). In der ersten Hälfte des circadianen Zyklus führt die Hemmung mit verschiedenen Vanadatkonzentrationen zu kleinen Phasenverfrühungen bis zu 5 Stunden innerhalb der subjektiven Tagphase. In der subjektiven Nachtphase treten dagegen große Phasenverzögerungen bis zu 10 Stunden auf, die mit der Vanadatkonzentration (5 mM - 10 mM) zunehmen. Vanadatinduzierte Phasenverschiebungen sind pH-abhängig mit einem Maximum von pH 7.5 in allen Experimenten. Dieser Wert stimmt auch mit dem pH-Optimum des pH-abhängigen Vanadattransportsystems II in Neurospora crassa überein (Bowman 1983).

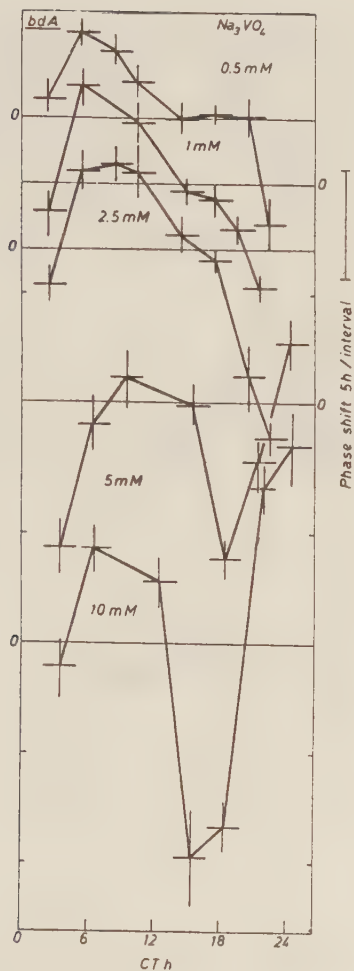


Abb. 4 Phasen-Response-Kurven für Vanadat (Na_3VO_4)-Pulse verschiedener Konzentration. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert der Phasenverschiebung von 6 Proben nach einem 3-stündigen Vanadatpuls (horizontale Linie) im Vergleich mit 6 Kontrollproben. Die vertikale Linie zeigt die Standardabweichung.
 Ordinate: Phasenverschiebung in Stunden (+ Verfrühung, - Verzögerung für den Wildtyp bd A)
 Abszisse: circadiane Zeit (CT) in Stunden unter konstanten Dauerdunkel-Bedingungen bezogen auf den Zeitpunkt des Hell-Dunkel-Wechsels (CT 12).

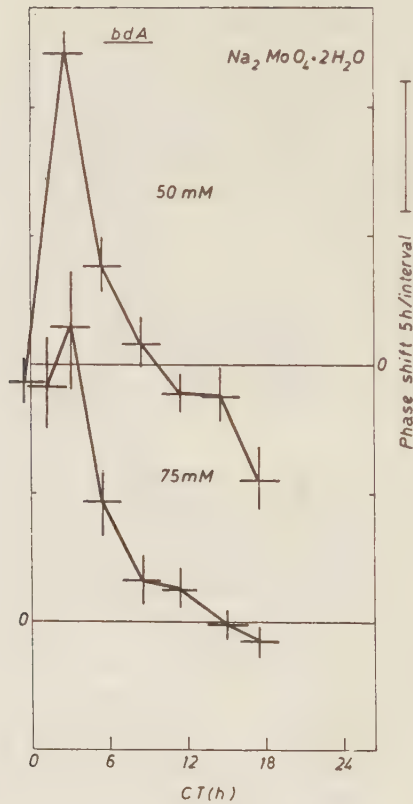


Abb. 5 Phasen-Response-Kurven für Molybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) Pulse verschiedener Konzentration in bd^2A . Weitere Einzelheiten wie in Abb. 4.

Für die phasenverschiebende Wirkung von Molybdat ist eine große Phasenverfrühung von 12 Stunden während der subjektiven Tagphase charakteristisch (Abb. 5). Die Phasen-Response-Kurve stimmt daher mit der Vanadat-Kurve nicht überein.

3.1.2. Phasenverschiebungen durch N-Ethylmaleimid, Azid, Cyanid und Oligomycin

Um zwischen a) Wirkungen auf die Plasmamembran und anderen ATPase- und Kinaseaktivitäten und b) Wirkungen auf die innere Mitochon-

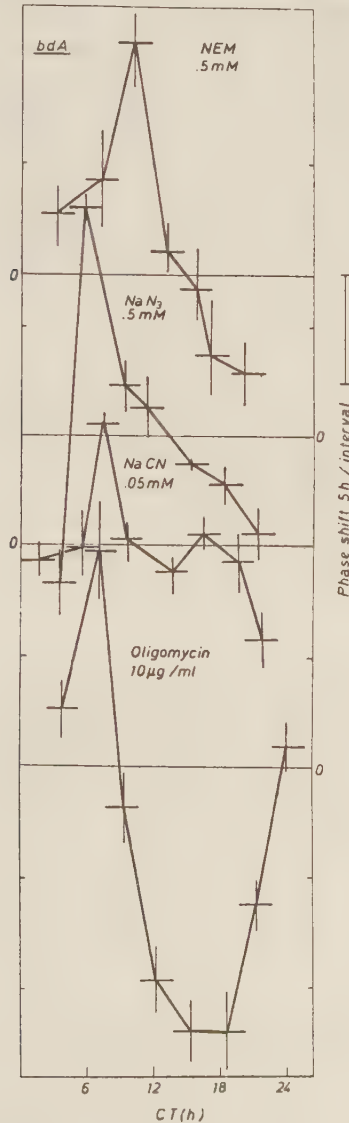


Abb. 6 Phasen-Response-Kurven für N-Ethylmaleimid (NEM)-, Azid (NaN₃)-, Cyanid (NaCN)- und Oligomycinpulse in bd A. Weitere Einzelheiten wie in Abb. 4.

drienmembran unterscheiden zu können, wurden eine Reihe mitochondrialer Hemmstoffe getestet. N-Ethylmaleimid hemmt den mitochondrialen Proton- und Phosphattransport über verschiedene SH-abhängige Reaktionen (Reynafarje, Lehninger 1978, Jagus et. al. 1982). Azid und Cyanid hemmen den mitochondrialen Elektronentransport. Azid hemmt zusätzlich die isolierte, entkoppelte mitochondriale ATPase. Oligomycin hemmt spezifisch die mitochondriale ATPsynthetase (Racker 1970). Alle hier angeführten mitochondrialen Inhibitoren bewirken eine große Phasenverfrühung innerhalb der subjektiven Tagphase von CT 6 - 10 (Abb. 6). Die oligomycin-induzierte Phasen-Response-Kurve unterscheidet sich von den anderen PRCs während der subjektiven Dunkelphase, da die Phasenverzögerungen größer sind und ein paar Stunden eher beginnen. Der Verlauf dieser Phasenverzögerungen weist auf Übereinstimmungen mit denen bei 10 mM Vanadat (Abb. 4) hin.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die Mitochondrien oder ein mitochondrienabhängiger Prozeß zur Aufrechterhaltung einer normalen Funktion der "Uhr" im Wildtyp von Neurospora crassa eine wichtige Rolle spielt. Daher wurde in der folgenden Versuchsserie die Reaktion der mitochondrialen Mutante "poky" auf Licht und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

3.1.3. Phasenverschiebungen durch DCCD und Licht im Wildtyp bdA im Vergleich mit der mitochondrialen Mutante bd poky A

DCCD hemmt die ATPasen der Mitochondrien, Plasmamembran und Vakuolenmembran in Neurospora crassa (E. Bowman 1983). Am besten untersucht ist die kovalente Bindung des DCCD an die Untereinheit 9 der mitochondrialen ATPsynthetase (das sogenannte DCCD-bindende Protein), wo auch das Oligomycin einwirkt (Sebald et. al. 1980).

Der Kurvenverlauf der PRCs für DCCD und Licht stimmt sowohl im Wildtyp bdA wie auch in der mitochondrialen Mutante bd poky A

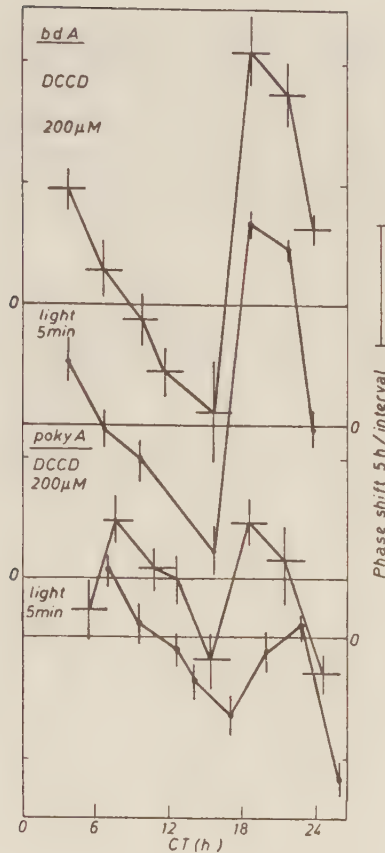


Abb. 7 Phasen-Response-Kurven für N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)-Pulse und Lichtpulse im Wildtyp bdA (oben) und in der mitochondrialen Mutante bd poky A (unten). Die Lichtpulse dauerten 5 Minuten. Weitere Einzelheiten wie in Abb. 4.

überein (Abb. 7). In der Mutante ist die Amplitude der Phasenverschiebung signifikant verkleinert. Im Wildtyp bdA beträgt die Verzögerung zum Zeitpunkt CT 16 4 Stunden und die Verfrühung zum Zeitpunkt CT 19 11 Stunden, während in bd poky A die Verzögerung und die Verfrühung 3 bzw. 5 Stunden betragen. Deshalb sind entweder der intakte mitochondriale Elektronentransport

oder ein Cytochrom-b-ähnlicher Bestandteil der Plasmamembran, der in poky reduziert ist (Brain et. al. 1977) oder beides zusammen bedeutsam für die DCCD- und Lichtantwort in Neurospora crassa. Dagegen scheint das normale Funktionieren der "Uhr" auf Grund der intakten Sporulationsrhythmik durch den veränderten mitochondrialen Phänotyp nicht beeinträchtigt zu sein.

3.1.4. Phasenverschiebungen durch Cycloheximid (CHX) im Wildtyp bdA im Vergleich mit der mitochondrialen Mutante bd poky A

Um zu überprüfen, ob die "Uhr" der mitochondrialen Mutante poky genauso wie der Wildtyp auf Pulse von Proteinsyntheseinhibitoren reagiert (Nakashima et. al. 1981), wurden die Reaktionen beider Stämme überprüft (Abb. 8). Die Experimente wurden bei 30° C durchgeführt, da die Antwort auf Licht in poky (nicht abgebildet) genauso wie im Wildtyp (Nakashima, Feldman 1980) temperatursensitiv ist. Die Phasen-Response-Kurven für Cycloheximid sind demgegenüber für beide Stämme nahezu identisch und die größten Phasenverfrühungen treten zum Zeitpunkt CT 6 in der Mitte der subjektiven Tagphase und die größten Verzögerungen zum Zeitpunkt CT 21 am Ende der subjektiven Dunkelphase auf. Damit sind die Reaktionen auf Cycloheximid eindeutig nicht temperatursensitiv.

Diese Ergebnisse stehen darüberhinaus im Gegensatz zu den mit Licht und DCCD erzielten Resultaten unter den gleichen experimentellen Bedingungen.

3.2. ³¹P-Kernresonanz (NMR) - in vivo - Spektroskopie

Mit Hilfe der NMR-Methodik sollen die in vivo Untersuchungen fortgesetzt werden. Es wird dabei geprüft, ob die durch externe Störpulse beobachtbaren Phasenverschiebungen der circadianen Sporulationsrhythmik auf interne Veränderungen des mit dieser Methodik beobachtbaren Phosphatstoffwechsels zurückführbar sind. Weiterhin sollen die Rhythmikmutanten auf Veränderungen des Energiestoffwechsels hin analysiert werden.

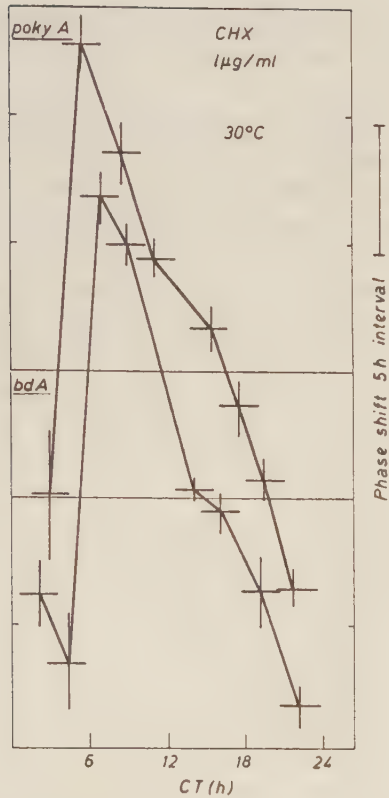


Abb. 8 Phasen-Response-Kurven für Cycloheximid (CHX)-Pulse in der mitochondrialen Mutante *bd poky A* (oben) und dem Wildtyp *bd A* (unten) bei 30°C. Weitere Einzelheiten wie in Abb. 4.

3.2.1. ^{31}P -NMR-Spektren vom Wildtyp *bd A* im Vergleich zu den Rhythmusmutanten *frq 1 A* und *frq 7 A*

Zur Untersuchung der Frage, ob verschiedene Periodenlängen der circadianen Rhythmik durch Unterschiede des Energiestoffwechsels verursacht oder mit diesem korrelierbar sind, wurden NMR-Spektren vom Wildtyp *bd A* mit denen der Frequenzmutanten *frq 1 A* und *frq 7 A* verglichen. Der Zustand des Energiestoffwechsels unter

stationären Bedingungen war von besonderem Interesse, da er ohne Einfluß auf die circadiane Rhythmik sein soll (Nakashima 1981).

Reproduzierbare Spektren von Neurospora-crassa-Mycelien wurden über einen Zeitraum von 16 bis 24 Stunden aufgenommen. Die Spektren zeigen deutlich identifizierbare Signale für ATP + ADP, anorganisches Phosphat, NAD + NADP und mobiles Polyphosphat.

^{31}P NMR-Spektren vom Wildtyp bdA (A) der Mutante frq 1 A (B) und der Mutante frq 7 A (C) sind zum Zeitpunkt ihres ATP + ADP - Maximums (Abb. 9) abgebildet. Dieses Maximum ist für die einzelnen

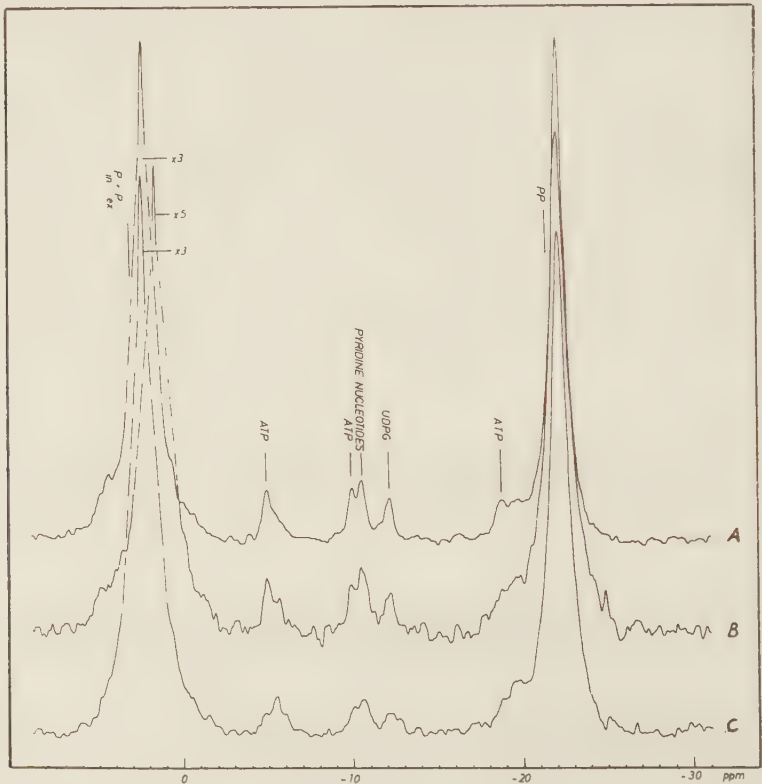


Abb. 9 ^{31}P NMR-Spektren vom Wildtyp (A), frq 1 A (B) und frq 7 A (C). Die Spektren wurden zum Zeitpunkt des ATP + ADP - Maximums aufgenommen und auf gleiche Polyphosphatwerte hin standardisiert.

Stämme zu verschiedenen Zeiten nach dem Hell-Dunkel-Wechsel zu finden. Die Spektren wurden auf einen einheitlichen Phosphat (PP)-Wert hin standardisiert. Die Unterschiede im Gehalt der Adenin- und Pyridinnucleotide beim Vergleich der drei Stämme waren nicht signifikant.

Bei der Registrierung von NMR-Spektren über 24 Stunden unter stationären Bedingungen in einem Durchflußmedium zeigen sich die in Abb. 10 dargestellten Veränderungen. In allen Stämmen

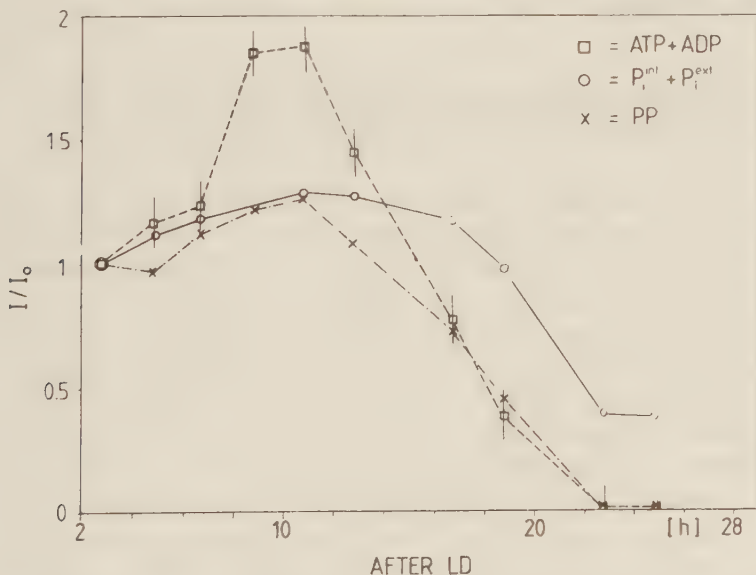


Abb. 10 Die Intensität von ATP + ADP, internem anorganischen Phosphat und externem anorganischen Phosphat ($P_i^{int.} + P_i^{ext.}$) und Polyphosphat als Funktion der Zeit nach dem Hell-Dunkel-Wechsel. Die Intensitäten wurden normiert für den Zeitpunkt 3 Stunden nach dem Hell-Dunkel-Wechsel.

nimmt unter Hungerbedingungen zunächst die Polyphosphatkonzentration und dann das anorganische Phosphat ab. Im einzelnen wird der Phosphatstoffwechsel zunächst stimuliert mit einer deutlichen Zunahme des ATP + ADP bis etwa 10 Stunden nach dem Hell-Dunkel-Wechsel und nimmt dann kontinuierlich ab. Diese Er-

gebnisse stimmen mit NMR-Daten der mit Neurospora crassa nahe verwandten Hefe überein (Nicolay et. al. 1982, 1983). Die Polyphosphathydrolyse verbunden mit einer Zunahme des zellulären anorganischen Phosphats tritt dabei nach Glucoseverbrauch und ATP-Abbau auf. Nach etwa 22 Stunden ist unter für die Untersuchung der Rhythmik standardisierten Hungerbedingungen nur noch das anorganische Phosphat ($P^{int.} + P^{ext.}$) nachweisbar. Rhythmische Veränderungen des Energiestoffwechsels über diesen Zeitraum hinaus sind nur mit empfindlicheren in vitro-Methoden zu erfassen (Abschnitt 3.3.).

3.2.2. ^{31}P NMR-Spektren vom Wildtyp bdA nach Pulsen von phasenverschiebenden Stoffwechselinhibitoren

Einige der Stoffwechselinhibitoren, die die Phase der Sporulationsrhythmik in Neurospora crassa verschieben (Abschnitt 3.1.) wurden in ihrer Wirkung auf den Phosphatstoffwechsel untersucht. Konzentration und Pulsdauer der Hemmstoffe wurden, genauso wie in Abschnitt 3.1. beschrieben, gewählt. Im einzelnen wurde die Wirkung von Molybdat, Azid, Cyanid und DCCD untersucht. Im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle wird durch Azid, Cyanid und Molybdat das ATP + ADP verringert und das anorganische Phosphat erhöht. Der Polyphosphatgehalt wird durch Azid stärker als durch Molybdat reduziert und durch Cyanid vermehrt (Abb. 11). DCCD hat keine Wirkung. Da DCCD auch eine andere PRC als die übrigen Hemmstoffe hat, erfolgt die Einwirkung auf den circadianen Oszillator möglicherweise über einen anderen molekularen Mechanismus.

Spektren, die kurz nach einem Vanadatpuls aufgenommen wurden, zeigten eine vorübergehende deutliche Erhöhung der Zuckerphosphate. Wirkungen von Vanadat auf die Phosphofructokinase sind beschrieben (Choata, Mansour 1978). Die zum Vergleich mit den Phasen-Response-Kurven notwendigen Vanadatversuche konnten nicht durchgeführt werden, da unter den gewählten phosphatfreien Versuchsbedingungen kein NMR-Spektrum nachweisbar ist.

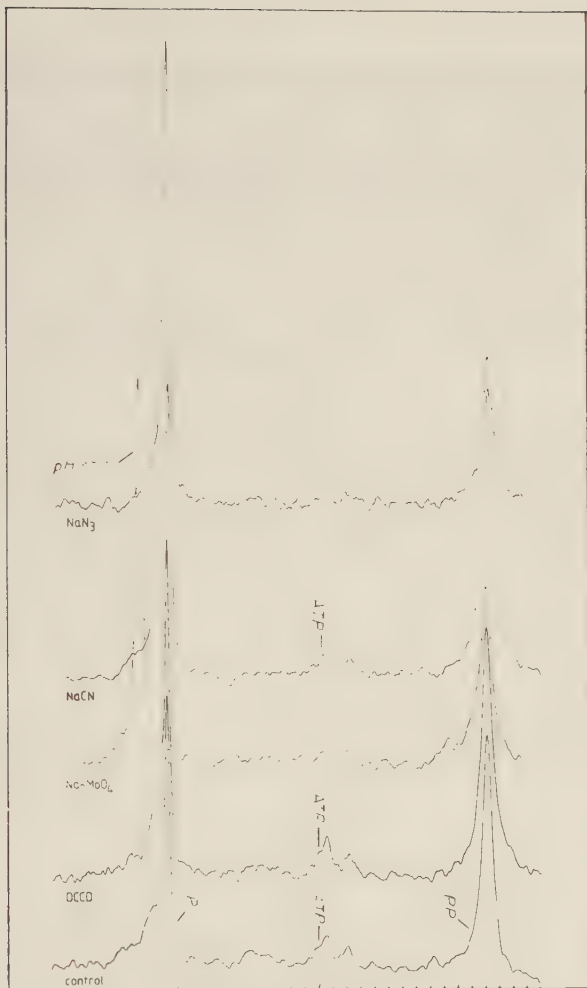


Abb. 11 ^{31}P -NMR-Spektren vom Wildtyp bdA nach Hemmstoffpulsen von Azid, Cyanid, Molybdat und DCCD im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dauer und Konzentration der Pulse wie in Abschnitt 3.1.

3.3. Circadiane Rhythmik im Energycharge vom Wildtyp bd A

Der Gesamtenergycharge (AEC) in Extrakten von bdA Mycelien in Flüssigkultur ändert sich während des Untersuchungszeitraumes von 36 Stunden (Abb. 12). In drei unabhängigen Experimenten

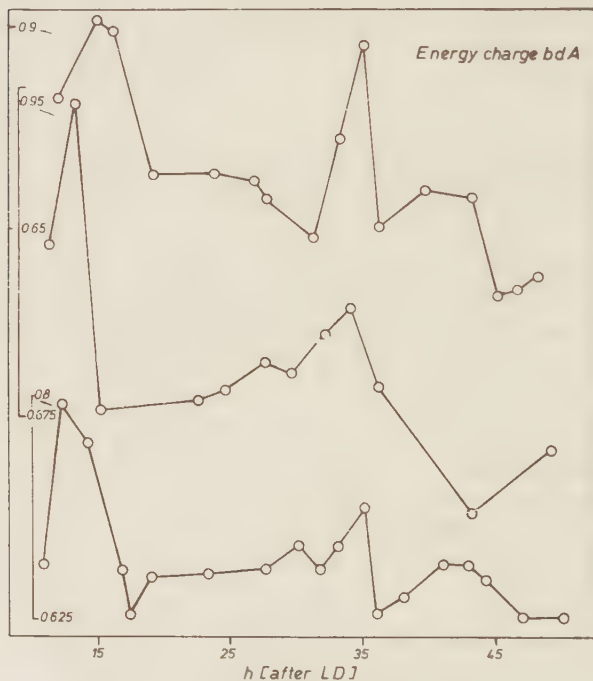


Abb. 12 3 unabhängige Energychargeexperimente mit dem Wildtyp bdA unter stationären Bedingungen in 0.03 %iger Glucose-Flüssigkultur.
Ordinate: Energycharge (Berechnung siehe Material und Methoden)
Abszisse: Zeit in Stunden bezogen auf den Hell-Dunkel-Wechsel

entspricht das Intervall zwischen zwei deutlich ausgeprägten Maxima des Energycharge der circadianen Periodenlänge dieses

Stammes (20 - 22 Stunden). Die Amplitude des AEC beträgt 0.1 - 0.3. Die abnehmende Tendenz der Kurve entspricht den in vivo - NMR-Ergebnissen (Abb. 10) und ist auf die Kultivierung in niedriger Glucose zurückzuführen. Diese Ergebnisse mit konidienfreien Flüssigkulturextrakten entsprechen der mit Konidienextrakten auf Agar gefundenen circadianen Rhythmik (Delmer, Brody 1975). Damit ist gezeigt worden, daß die circadianen Unterschiede im Gesamtenergycharge unabhängig von der vegetativen circadianen Konidiendifferenzierung sind.

Um zu zeigen, daß diese Oszillation auch unabhängig vom *bd*-Gen oder Genprodukt ist, wurde der AEC auch an einem Stamm ohne *bd*-Phänotyp gemessen. Die temperatursensitive mitochondriale Mutante C 93 entspricht bei 25° C in allen Eigenschaften dem Wildtyp. Die gemessenen zeitlichen Unterschiede des Energycharge (Abb. 13)

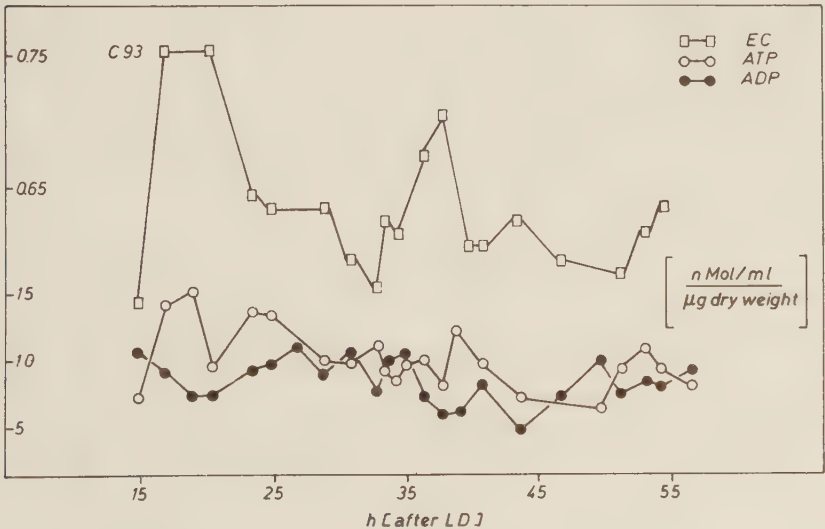


Abb. 13 Energycharge, ATP- und ADP-Gehalt in C 93 bei 25° C unter Hungerbedingungen.
Weitere Einzelheiten wie in Abb. 12.

entsprechen ziemlich genau denen, die mit dem bdA-Stamm gefunden worden sind. Damit ist neben der phänotypischen Ausprägung auch die genetische Information für die circadiane Konidienbildung nicht die Ursache für die circadianen Veränderungen des Energycharge. Die zeitlichen Konzentrationsunterschiede für ATP und ADP haben ein circadianes Muster mit Maxima und Minima, die etwa 180° phasenverschoben sind (Abb. 13). Bei 37°C wird der Adeninnucleotidgehalt um 50 % reduziert (nicht abgebildet). Circadiane Unterschiede sind dann nicht mehr signifikant.

3.4. Circadiane Unterschiede im ATP/ADP-Verhältnis der frq-Mutanten

Zur weiteren Untersuchung der circadianen Kontrolle des Energiestoffwechsels wurde das ATP/ADP-Verhältnis im Wildtyp bdA mit dem der Mutanten frq 1 A und frq 7 A verglichen (Abb. 14). Das ATP/ADP-Verhältnis hat ein ähnliches Muster wie der Gesamtenergycharge. Das Intervall zwischen den Maxima liegt im Bereich der circadianen Periodenlänge der drei Stämme: frq 1 A ungefähr 15 Stunden, bdA ungefähr 20 Stunden und frq 7 A ungefähr 25 Stunden. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, daß der Adeninnucleotidpool durch den circadianen Oszillator kontrolliert wird oder ein Teil davon ist.

Der Mittelwert für das ATP/ADP-Verhältnis über den gesamten Meßzeitraum beträgt 1.29 für frq 1 A, 1.11 für bdA und 1.09 für frq 7 A. Diese kleinen, nicht signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Stämmen wurden auch bei den ATP + ADP-Intensitäten in den ^{31}P NMR-Spektren (Abb. 9) gefunden.

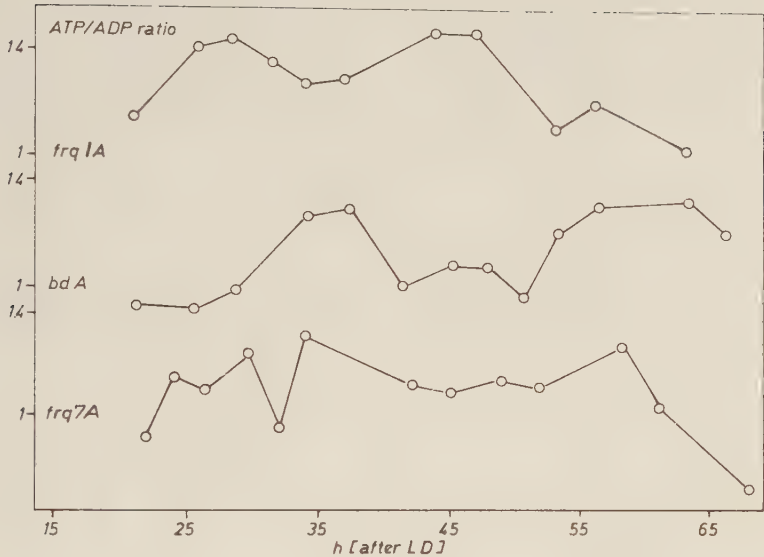


Abb. 14 ATP/ADP-Verhältnis für den Wildtyp *bd A* im Vergleich zu den Mutanten *frq 1 A* und *frq 7 A*. Weitere Einzelheiten wie in Abb. 12.

3.5. Circadiane Unterschiede der ATPase-Aktivität

3.5.1. Konidienextrakte von *bd csp*-Agarkulturen

Die Experimente wurden mit dem Stamm *bd csp* auf Agar durchgeführt. Abb. 15 zeigt circadiane Unterschiede in der ATPase-Gesamtaktivität von Konidienextrakten. Die Periodenlänge der Sporulationsrhythmik auf Maltose beträgt für diesen Stamm etwa 22 Stunden bei 25° C, was mit der Periodenlänge von *bd A* auf Glucose ungefähr übereinstimmt. Die Aktivität wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten untersucht: pH 8.2 entspricht dem Optimum der mitochondrialen ATPase, und pH 6.7 entspricht dem Optimum

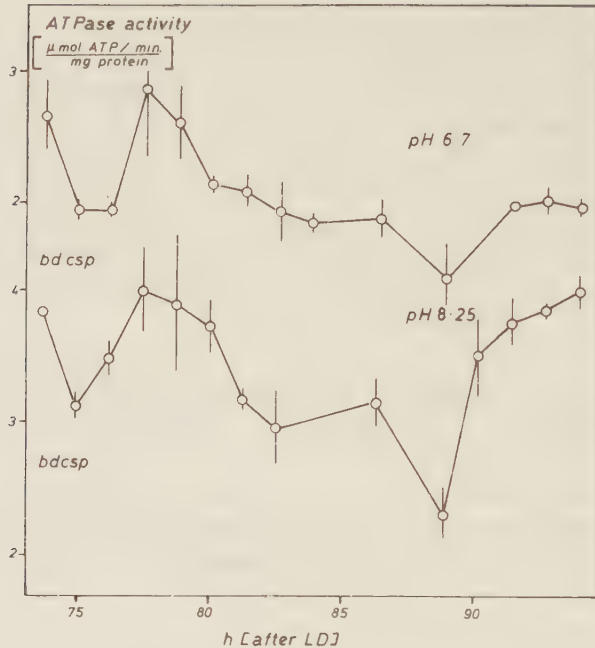


Abb. 15 ATPase-Aktivität in Konidienextrakten von *bd csp* auf Agarmedium bei zwei verschiedenen pH-Werten. Die Zeit in Stunden bezogen auf den Hell-Dunkel-Wechsel bezieht sich auf die Wachstumsfront. Die Proben für die Extrakte wurden in einem Bereich hinter der Wachstumsfront geerntet, in dem die Wachstumsfront 2 circadiane Zyklen vorher markiert wurde.

der Plasmamembran-ATPase. Um die Aktivität der Plasmamembran-ATPase messen zu können, wurde zusätzlich 5 mM Azid dem Reaktionsgemisch zugesetzt, um die mitochondriale Aktivität auszuschalten (Bowman et. al. 1978). Das zeitliche Muster der ATPase-Gesamtaktivität ist identisch bei den beiden pH-Werten. Die höchste Aktivität ist bei pH 8.2 zu finden und die geringste bei pH 6.7 (+ Azid). Auf Grund der Variabilität der Periodenlänge kann die Phasenlage der Rhythmik zum Vergleich mit anderen rhythmischen Variablen nicht genau ermittelt werden. Die

ATPase-Aktivität ist unabhängig von der Petrischalenregion aus der die Proben entnommen werden, da Proben der Wachstumsfront das gleiche zeitliche Muster haben (nicht abgebildet). Die Expression der circadianen Oszillation ist also unabhängig vom Alter synchron (Dharmananda, Feldman 1979).

3.5.2. Mycelienextrakte von bdA - Flüssigkulturen

Zur Untersuchung der von der Konidiendifferenzierung unabhängigen ATPase-Aktivität wurden Flüssigkulturen von bdA verwendet.

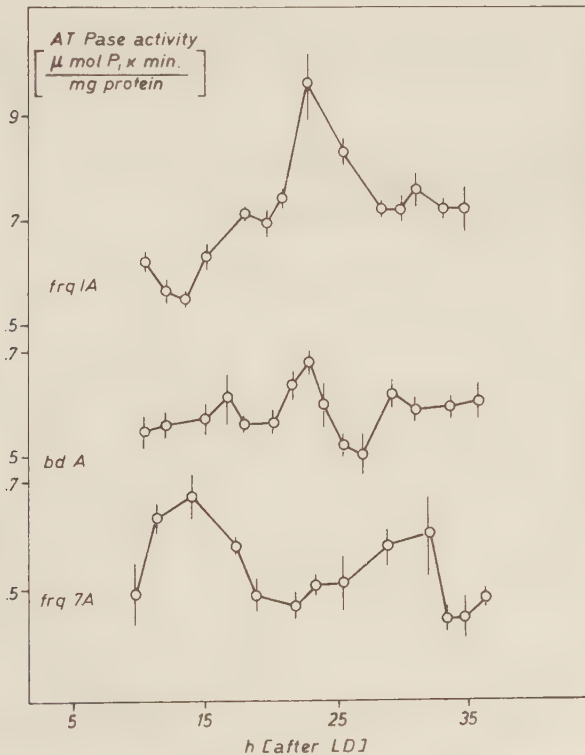


Abb. 16 ATPase-Aktivität in Mycelienextrakten vom Wildtyp bdA und den Mutanten frq 1 A und frq 7 A in Glucoseflüssigkultur. Weitere Einzelheiten wie in Abb. 12.

Die höchste ATPase-Aktivität (Abb. 16) sowohl des Wildtyps wie auch der Frequenzmutanten ist nicht in Phase mit dem ATP/ADP-Verhältnis (Abb. 14). Für *bdA* und *frq 7 A* beträgt die Verschiebung ungefähr 180° , für *frq 1 A* weniger. Die umgekehrte Phasenlage zwischen ATPase-Aktivität und ATP/ADP-Verhältnis weisen eher auf Oszillation(en) der ATPase (Plasmamembran, Vakuolenmembran etc.) als auf solche der ATPsynthetase der Mitochondrien hin.

3.5.3. Mycelienextrakte von *bdA* - Flüssigkulturen nach Vanadat-hemmung

Durch Zusatz von 1 mM Vanadat zu den Mycelienextrakten wird die ATPase-Gesamtaktivität um ca. 20 % gesenkt. Das zeitliche Akti-

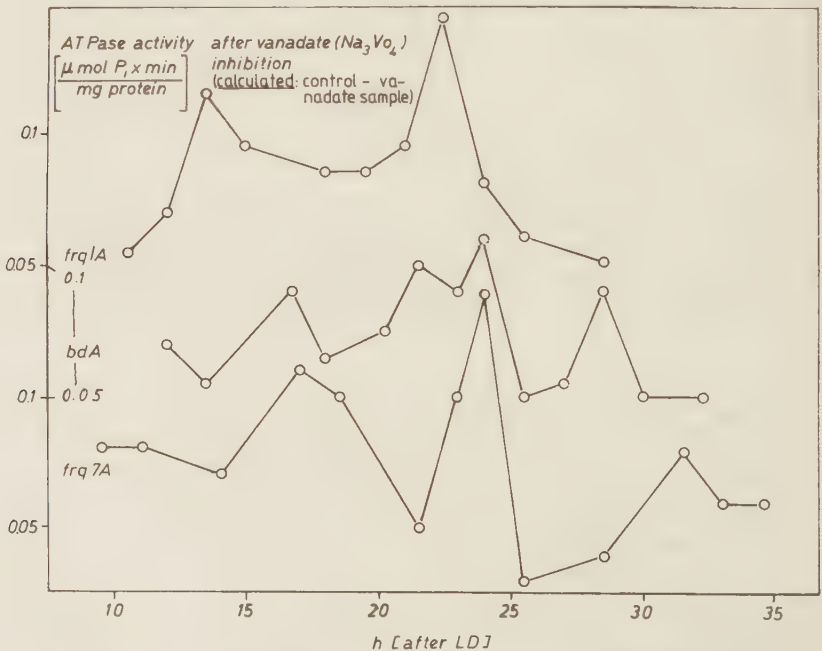


Abb. 17 ATPase-Aktivität in Mycelienextrakten vom Wildtyp *bdA* und den Mutanten *frq 1 A* und *frq 7 A* nach Vanadathemmung (1 mM) in Glucoseflüssigkultur. Weitere Einzelheiten wie in Abb. 12.

vitätsmuster nach Subtraktion der mit Vanadat behandelten Extrakte von denen ohne Vanadat zeigt Abb. 17 für den Wildtyp *bda* und die Mutanten *frq 1 A* und *frq 7 A*. Die höchste Aktivität ist unabhängig von der unterschiedlichen Periodenlänge der 3 Stämme 22 - 24 Stunden nach dem Hell-Dunkel-Wechsel zu finden. In Proteinsyntheseuntersuchungen unter freilaufenden Bedingungen konnte gezeigt werden, daß die Synthese der Plasmamembran-ATPase nicht rhythmisch verläuft (Rensing et. al., im Druck).

4. Diskussion

4.1. Methoden

Zur Identifizierung rhythmischer Veränderungen des Energiestoffwechsels in Neurospora crassa wurden die ^{31}P -Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie, die Biolumineszenzmethodik und zwei Enzymtests zur Bestimmung der ATPase-Aktivität eingesetzt.

Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie ermöglicht in vivo-Untersuchungen, erfordert jedoch große Mengen an Zellmaterial, da diese Methodik sehr unempfindlich ist. Zur Untersuchung der circadianen Rhythmik ist diese Methode von besonderem Interesse, da sie die direkte Messung von möglichen rhythmischen Veränderungen des Energiestoffwechsels erlaubt.

Die Biolumineszenzmethodik zur Bestimmung der Adeninnucleotide ist bedeutend empfindlicher als die ^{31}P -NMR-Spektroskopie. Die Nachweisgrenze liegt etwa bei 10^{-12} Mol gegenüber 10^{-4} Mol bei der NMR-Spektroskopie. Nachteilig ist die geringe Stabilität von ATP in vitro unter den herrschenden Versuchsbedingungen und die indirekte Bestimmung der übrigen Adeninnucleotide ADP und AMP, die erst nach enzymatischer Umsetzung in ATP luminometrisch gemessen werden können. Die Fehlerrate bei der Bestimmung von AMP ist daher gegenüber der von ATP deutlich erhöht.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden zwei verschiedene Enzymtests eingesetzt:

Im ersten Fall wurde in einer gekoppelten Reaktion photometrisch die Umwandlung von NADH in NAD als Funktion der Zeit verfolgt. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Empfindlichkeit bei niedrigen ATP-Konzentrationen und die direkte Beobachtung der Reaktionskinetik. Der Nachteil besteht in der relativ langen Versuchsdauer zur Aktivitätsbestimmung, die die Anzahl der Probenahmen pro circadianen Zyklus begrenzt.

Im zweiten Fall wurde die Freisetzung von anorganischem Phosphat

nach ATP-Spaltung bestimmt. Der Vorteil der Methode besteht in der schnellen Präparation und Bestimmung der Proben. Nachteilig ist die geringere Empfindlichkeit gegenüber der zuerst vorgestellten Methode.

Durch die Verwendung von Gesamtzellextrakten in allen in vitro-Messungen können keine spezifischen Aussagen über Unterschiede zwischen Zellkompartimenten und verschiedenen ATPase-Spezies gemacht werden. Das Schnellextraktionsverfahren war aber notwendig, um eine möglichst große Anzahl von Meßpunkten pro circadianen Zyklus zu erhalten und möglichst alle für eine Schwingung in Frage kommenden Komponenten zu erfassen, da bisher kein(e) Genprodukt(e) der circadianen Rhythmik in Neurospora crassa identifiziert werden konnte(n).

4.2. Phasen-Response-Kurven

4.2.1. Wirkung der Hemmstoffe

Die Ergebnisse der Phasenverschiebungsexperimente zeigen, daß die circadiane Rhythmik von Neurospora crassa auf Hemmstoffe energieübertragender Prozesse reagiert. Zum Teil wurden ähnliche Experimente mit dem gleichen Ergebnis von Nakashima (persönliche Mitteilung) durchgeführt. Die Hemmstoffe wirken auf den molekularen Mechanismus der "Uhr" entweder über den ATP-Gehalt und den Energy-charge oder über energieabhängige Ionengradienten, Phosphorylierungs- oder Redoxpotentiale ein. Die Phasen-Response-Kurven verschiedener Inhibitoren - außer Licht und DCCD - sind relativ ähnlich: ein Maximum für die Phasenverfrühung wird hauptsächlich zwischen CT6 - 12 und ein Maximum für die Phasenverzögerung zwischen CT15 - 22 gefunden. Die Unterschiede der PRCs sind teilweise auf Konzentrationsunterschiede mit entsprechenden zusätzlichen Effekten zurückzuführen, da Konzentrationsunterschiede des gleichen Hemmstoffes (Vanadat) auch Unterschiede in der Lage und Aus-

prägung des Verzögerungsmaximums zur Folge haben. Die Ähnlichkeiten der PRCs legen nahe, daß die Wirkungen der Hemmstoffe den gleichen molekularen Prozeß betreffen (Drescher et. al. 1982, Cornelius, Rensing 1982).

Im Unterschied zu allen übrigen Hemmstoffen liegt das Maximum der Phasenverfrühung für DCCD und Licht zwischen CT18 - 24 und das Maximum der Phasenverzögerung zwischen CT12 - 18. Das bedeutet, daß entweder ein anderer molekularer Prozeß beteiligt ist oder der gleiche Prozeß wie zuvor in entgegengesetzter Richtung verschoben wurde (Drescher et. al. 1982).

Vanadat, Molybdat, NEM, Azid, Cyanid und Oligomycin hemmen verschiedene Prozesse: Vanadat hemmt die Plasmamembran ATPase und andere Phosphat- und ATP-abhängige Prozesse (Simons 1979), dagegen aber nicht die mitochondriale ATP-Synthetase und die ATPase der Vakuolenmembran (E. Bowman 1983), während Oligomycin und Azid spezifisch die mitochondriale ATPsynthetase hemmen. Azid hemmt darüberhinaus genau wie Cyanid den mitochondrialen Elektronentransport und NEM den mitochondrialen Proton- und Phosphattransport (Reynafarje, Lehninger 1978).

Für Vanadat wird neben der Hemmwirkung auch eine stimulierende Wirkung bei geringem ATP-Angebot diskutiert. Ausgehend von zwei ATP-Bindungsstellen an diesem Enzym, wird bei der Bindung von ATP an die eine Untereinheit, die andere Untereinheit durch Vanadat kooperativ stimuliert (B. Bowman, persönliche Mitteilung). Bei niedrigen Vanadatkonzentrationen treten manchmal Verfrühungen und Verzögerungen nebeneinander zum gleichen circadianen Zeitpunkt in der subjektiven Nachtphase auf (Abb. 3), was als Stimulierung (Verfrühung) bzw. Hemmung (Verzögerung) interpretiert werden könnte.

Es muß berücksichtigt werden, daß alle Hemmstoffe in vivo pleiotrop wirken. Insbesondere Vanadat mit Wirkungen auf die H^+ -Sekretion, K^+ -Aufnahme, elektrische Potentialdifferenz (Cocucci et. al. 1979), Glycolyse (De Master, Mitchell 1973), die mitochondriale

Succinatdehydrogenase (Verlours et. al. 1975), die Atmung (Saxe, Sutter 1979) und die in in vivo NMR-Untersuchungen nachweisbare Hemmung des Gesamtphosphatstoffwechsels ist hier zu nennen. Trotz dieser Vielzahl möglicher Störungen, die sich auch für die anderen Hemmstoffe beschreiben ließe, zeigen die Phasen-Response-Kurven jedoch einen regelmäßigen Verlauf, der sich vom energetischen Status der Zelle (absoluter ATPgehalt) als relativ unabhängig erweist.

DCCD bindet in den hier vorgestellten Experimenten nicht kovalent an die mitochondriale ATP-Synthetase, da Neurospora nach dem Auswaschen von DCCD normal weiterwächst. Nakashima (1982) hat gezeigt, daß DCCD lichtinduzierte Phasenverschiebungen in einer bestimmten Phase hemmt. Die Hemmung ist pH-abhängig. Die Ergebnisse hier zeigen einen nahezu identischen Verlauf der PRCs. Ob DCCD den Protonenkanal blockiert oder an einer der drei beschriebenen ATPasen (E. Bowman 1983) angreift, ist nicht bekannt. In Schizosaccharomyces pombe hemmt DCCD die Protonenaufnahme durch die Plasmamembran (Nassar und Höfer 1982). Slayman (1973) beschreibt eine direkte Wirkung des DCCD auf das Membranpotential von Neurospora crassa. Ein Cytochrom b-ähnlicher Bestandteil der Plasmamembran könnte ebenfalls an der Übertragung der DCCD- und Lichtwirkung beteiligt sein, da sowohl dieser Bestandteil (Brain et. al. 1977) wie auch die phasenverschiebende Wirkung in der mitochondrialen Mutante poky verändert sind.

Die Annahme, daß DCCD und Licht an einem gemeinsamen Punkt angreifen, wird auch durch die Temperatursensitivität beider Wirkungen (Nakashima, Feldman 1980, Schulz, nicht abgebildet) nahegelegt. Dieser Faktor könnte auch die Protonenkonzentration beeinflussen (in umgekehrter Richtung im Vergleich zu den anderen Hemmstoffen auf Grund der veränderten Phasenlage der PRCs).

4.2.2. Ergebnisse anderer Autoren

Experimente von Nakashima mit Diethylstilbestrol (DES) (Nakashima 1982), Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon (CCCP) (persönliche Mitteilung) und Antimycin A (Nakashima 1984) führen zu ähnlichen PRCs in Neurospora crassa, mit maximalen Verfrühungen in der ersten und maximalen Verzögerungen in der zweiten Hälfte des circadianen Zyklus.

Es gibt Hinweise von anderen Organismen, z.B. Aplysia, daß die PRCs für Cyanid, 2,4-DNP, Anisomycin und Puromycin die gleiche Phasenlage haben (Zusammenfassung: Cornelius und Rensing 1982), während die PRCs für Serotonin und cAMP, die die Phosphorylierungsrate erhöhen, eine andere Phasenlage haben (Eskin et. al. 1982).

Für Kalanchoe blossfeldiana wurden Phasenverzögerungen von 1.7 - 4.2 Stunden für Vanadat beschrieben. Molybdat induzierte dagegen keine Phasenverschiebungen in diesem Organismus. Die Ergebnisse wurden als Hinweis auf eine direkte oder indirekte Beteiligung der Plasmalemma-ATPasen an der circadianen Rhythmik gedeutet (Eckhardt 1982). Cyanid-Pulse beim gleichen Organismus (Steinheil 1969) bewirken eine ähnliche Phasen-Response-Kurve wie Vanadat. Die Cyanidwirkung auf die Mitochondrien könnte eine Veränderung der Energieversorgung der Plasmalemma-ATPasen hervorrufen. Da diese Hemmstoffe in Neurospora crassa neben Verzögerungen auch Verfrühungen hervorrufen, kann eine andere Wirkung auf den circadianen Oszillator nicht ausgeschlossen werden.

4.2.3. Nichtrhythmische Veränderungen

Bei den NMR-Messungen wurden unterschiedliche pH-Gradienten zu verschiedenen Zeiten nach dem Hell-Dunkel-Wechsel. Die Abhängigkeit des intracellulären pH-Wertes vom Energiestoffwechsel (Sanger, Slayman 1982) ist dabei wahrscheinlicher als vom circa-

dianen Oszillator (Johnson 1983). Es wurden pH-Werte von 7.2 (± 0.2), 6.3 (± 0.2) und 5.8 (Medium) gemessen. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit ^{15}N NMR-Messungen in Neurospora crassa (Legerton et. al. 1983), wo ein pH von 6.1 ± 0.4 für die Vakuole und ein pH von 7.15 ± 0.1 für das Cytoplasma gefunden wurde. Für die Aufrechterhaltung der pH-Gradienten ist ein ausreichendes Glucoseangebot notwendig. Bei Standardminimalbedingungen zur Messung der circadianen Rhythmik ist dieser Gradient kleiner 0.7. Die Abhängigkeit des pH-Gradienten vom Glucoseangebot wurde auch für Candida utilis gefunden (Nicolay et. al. 1983). Genau wie in diesen Versuchen ist auch in Neurospora-Mycelien in Flüssigkultur der Abbau des pH-Gradienten mit einer Abnahme der Zuckerphosphate und einer Zunahme des anorganischen Phosphats verbunden. In allen bisher untersuchten Hefen wurde ein pH-Gradient von 0.8 - 1.5 über die Vacuolenmembran gefunden, wenn ausreichend Energie vorhanden ist. Zur Aufrechterhaltung des Gradienten wird eine Mg^{2+} -abhängige, Protonen-transportierende ATPase diskutiert, deren katalytisches Zentrum zum Cytoplasma zeigt (Kakinuma et. al. 1981). In Pflanzenvacuolen wurde die Bedeutung der Tonoplasten-ATPase für die pH-Homöostase des Cytoplasmas gezeigt (Marin und Blasco 1982).

In Neurospora crassa wurden die Eigenschaften dieses Enzyms mit denen der Mitochondrien und der Plasmamembran verglichen (E. Bowman 1983). Es handelt sich um einen dritten ATPasetyp, der Protonen wie die Plasmamembran-ATPase überträgt (Bowman und Bowman 1982), in seinem Aufbau mehr der mitochondrialen ATPase gleicht und DCCD-, aber nicht vanadat- und azidempfindlich ist. Inwieweit diese ATPase am Phosphattransport beteiligt ist, ist unklar. Das Polyphosphat wird in der Vakuole gespeichert (Nicolay et. al. 1983) und wahrscheinlich durch eine alkalische Phosphatase in Phosphat gespalten (Fernandez et. al. 1981). Vanadat hemmt auch die alkalische Phosphatase (Lopez et. al. 1976). In Neurospora-Flüssigkulturen schwankt der Polyphosphatspiegel über 24 Stunden nur geringfügig im Vergleich zum anorganischen Phosphat und zum ATP und Zuckerphosphat. Allerdings ist die PP-Hydrolyse in der Vakuole auch stets mit einer Zuckerphosphatsynthese im Cytoplasma

verbunden (Nicolay et. al. 1983), die in den Flüssigkulturen zu Versuchsbeginn bereits abgeschlossen ist. Daß die Regulation der Polyphosphatgehalte neben der Lieferung von anorganischem Phosphat auch für den Energiestatus der Zelle bedeutsam ist (Nicolay et. al. 1983), wird auf die unterschiedliche Reaktion von Hefen auf Glucose und Äthanol zurückgeführt. Die Periodenlänge der circadianen Rhythmik von Neurospora crassa ist dagegen auf Glucose und Acetat gleich. Die Wechselwirkung von Cytoplasma und Vakuole könnte unter der oben gemachten Voraussetzung durch den Vergleich von Phasen-Response-Kurven auf Glucose und Äthanol oder Acetat mit Hemmstoffen von Phosphatasen (Molybdat, Vanadat) und der Vakuolenmembran-ATPase (Quercetin) untersucht werden.

Bei der Überprüfung der Wirkung von Molybdat-, Azid-, Cyanid- und DCCD-Pulsen in in vivo NMR-Versuchen trat eine sofortige Wirkung von Molybdat (innerhalb von Minuten), eine demgegenüber verlangsamte Wirkung von Azid und Cyanid und keine Wirkung von DCCD auf. Mit der Hemmwirkung war jeweils eine Verringerung von ATP + ADP und vom Polyphosphat und eine Vermehrung des anorganischen Phosphats verbunden. Die deutliche Erhöhung des Polyphosphats durch Cyanid einerseits und die Verringerung durch Azid andererseits könnte mit einer entgegengesetzten Einwirkung auf die Vakuolenmembran-ATPase über den ATP-Spiegel erklärt werden. Die stärkere Hemmwirkung von Molybdat gegenüber Azid bzw. Cyanid könnte auf die sekundäre Wirkung dieser Hemmstoffe über den mitochondrial kontrollierten ATP-Spiegel interpretiert werden. Der verringerte ATP-Gehalt würde dann die Plasmamembran-ATPase und andere Phosphorylierungsreaktionen hemmen, die durch Vanadat und Molybdat direkt gehemmt werden. Die Wirkung von Diethylstilbestrol (DES) auf den circadianen Oszillator verläuft ebenfalls in dieser indirekten Weise über die Mitochondrien, obwohl DES auch auf die isolierte Plasmamembran-ATPase einwirkt (Balke, Hodges 1979, Nakashima 1982).

Daß Cyanid, das genau wie Azid auf den mitochondrialen Elektronentransport einwirkt, das Polyphosphat-Profil entgegengesetzt verändert, könnte durch die höhere Konzentration des Azid erklärt werden. Darüberhinaus verändern die beiden Hemmstoffe das

Membranpotential in Neurospora in entgegengesetzter Weise (Slayman et. al. 1973, Slayman und Slayman 1975). Die Wirkungslosigkeit von DCCD bestätigt, daß DCCD nicht über den gleichen biochemischen Prozeß wie die übrigen Stoffwechselinhibitoren auf den circadianen Oszillator einwirkt und den ATP-Spiegel nicht verändert. Damit kann die Wirkung auf die mitochondriale ATP-synthetase in vivo ausgeschlossen werden. Stattdessen ist eher eine Hemmung der Protonentranslokation anzunehmen (Linnett und Beechey 1979).

4.2.4. Schlußfolgerungen

Die Wirkungen der verschiedenen Hemmstoffe betreffen möglicherweise alle die Phosphorylierung und den Ionentransport oder beides. Proteinphosphorylierung könnte bei der Kontrolle der Proteinsynthese beteiligt sein. Gut beschriebene Beispiele sind die Phosphorylierung eines Initiationsfaktors (EIF 2, Jagus et. al. 1982) und des S 6-Proteins der kleinen ribosomalen Untereinheit (Gordon et. al. 1982). Die große Ähnlichkeit der PRC für Cycloheximid mit den PRCs der anderen Hemmstoffe legt diesen Schluß nahe. Weiterhin würde das bedeuten, daß die Hemmung der Phosphorylierung über das S 6-Protein zu einer Hemmung der Proteinsynthese führt. In der Reaktion auf Hitze ist eine solche Beziehung gefunden worden: eine Dephosphorylierung von S 6 war mit einer Abnahme der Syntheserate "normaler" Proteine und einer Zunahme der Syntheserate von Hitzeschockproteinen verbunden (Glover 1982). Hitzeschockexperimente mit Neurospora-Mycelien zeigen beides: eine Abnahme der Proteinsyntheserate und der Phosphorylierung eines bestimmten Proteins bei steigender Temperatur (Rensing et. al., im Druck). NEM könnte bei der Aktivierung des Initiationsfaktors EIF-2 über eine Reduzierung der SH-Gruppen beteiligt sein (Trachsel et. al. 1978, Jagus et. al. 1982).

Ein anderer Wirkungsmechanismus, auf den die Hemmstoffe einwirken, könnte die Veränderung der Ionenkonzentration, speziell der Protonenkonzentration sein. Protonengradienten der Plasmamembran

können durch die Hemmung aktiver Transportsysteme (Vanadat, ATP-erniedrigende Agenzien, DES: Byington et. al. 1968) oder durch die Zunahme der Protonenpermeabilität (CCCP, DNP) beeinflußt werden. Der wichtigste Kontrollfaktor für den intrazellulären pH in Neurospora ist wahrscheinlich der Stoffwechsel (Sanger und Slayman 1982): die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Cyanid führt zu einer Abnahme des intrazellulären pH-Wertes von 0.7 pH-Einheiten, während die Freisetzung von Protonen durch die Hemmung der Protonenpumpe mit Vanadat den pH nicht so deutlich verschiebt. Die phasenverschiebende Wirkung von intrazellulären pH-Änderungen hat Johnson (1983) untersucht, der bei externen pH-Pulsen von 3 und 8.5 keine Veränderungen feststellte. Möglicherweise waren die Pulse zu kurz (15 min.), da externe pH-Pulse (4.0 und 8.0) von 4 Stunden zu Phasenverschiebungen von 12 Stunden (Verfrühung und Verzögerung) führen (Kruse, Rensing, nicht veröffentlicht). Die PRCs für saure Pulse liegen 3 Stunden hinter den PRCs der Stoffwechsellinhibitoren und CHX und die PRCs nach alkalischen Pulsen liegen 3 Stunden hinter denen für DCCD und Licht. Aufgrund dieser Unterschiede und der noch offenen Frage, ob alle phasenverschiebenden Agenzien tatsächlich den pH-Wert verändern, kann die Rolle der Protonen für den molekularen Mechanismus der "Uhr" nicht als gesichert gelten.

Der Bestandteil, der als Teil des Oszillators gefordert wird (rhythmische Aufnahme und Abgabe von Phosphat und Protonen) muß nicht notwendigerweise intrazelluläre pH-Oszillationen verursachen, wenn diese Veränderungen nur Teil eines Gesamtpools (Johnson 1983) sind, während signifikante Konzentrationsänderungen, die durch Hemmstoff- oder Lichtpulse herbeigeführt werden, den Prozeß je nach Phasenlage verzögern oder beschleunigen könnten.

4.3. Rhythmische Veränderungen

4.3.1. Energycharge und ATPasen

Um zu überprüfen, ob die phasenspezifische Wirkung der Hemmstoffe durch intrazelluläre Oszillationen des ATP-Stoffwechsels erklärt werden kann, wurde der Energycharge und die ATPase-Aktivität gemessen.

Für Keimlinge von Chenopodium rubrum wurde eine über mehrere Tage stabile circadiane Rhythmik des Energycharge nachgewiesen (Wagner et. al. 1974, Wagner 1976). Eine für Agarkulturen von Neurospora crassa beschriebene Rhythmik des Energycharge beruht auf einer circadianen AMP-Oszillation mit einem AMP-Maximum in der subjektiven Nachtphase und einem Energycharge-Maximum in der subjektiven Tagphase (Delmer, Brody 1975). Beide Arbeitsgruppen interpretieren ihre Versuchsergebnisse als Resultat einer Schwingung zwischen Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung. Der mitochondriale Anteil an dieser Schwingung müßte sich durch die Untersuchung der ATPase-Aktivität und die Verwendung von spezifischen Hemmstoffen in vitro ermitteln lassen.

Die Maxima für den Energycharge und das ATP/ADP-Verhältnis einerseits und die ATPase-Aktivität andererseits sind aber in Neurospora crassa-Flüssigkultur gegeneinander phasenverschoben. Bei den Versuchsbedingungen in Flüssigkultur mit 0.03 % Glucose ist daher der Anteil der mitochondrialen ATPsynthetasefraktion, die in vitro als ATPase vorliegt, entweder sehr gering oder gehemmt. Weitere Hinweise, daß es sich eher um die Plasmamembran-ATPase-aktivität als um die mitochondriale handelt, liefern die Hemmstoffversuche in vivo und in vitro und die NMR-Ergebnisse. In vitro ist die gemessene Enzymaktivität vanadatempfindlich und azidresistent. Die Phasen-Response-Kurven für Vanadat und Azid zeigen Übereinstimmungen in der Verfrühung in der subjektiven Tagphase, unterscheiden sich aber in der Verzögerung in der subjektiven Nachtphase.

In dieser Phase liegt das ATPaseaktivitätsmaximum und das Energychargeminimum. Trägt man den $\ln$ ATP/ADP als Funktion der Zeit für die NMR-Dauerversuche auf, stimmt das in vitro gemessene Maximum der Enzymaktivität mit dem Abfall dieser Kurve überein. Die Schwingung der ATPaseaktivität kann aber nicht allein durch das ATPangebot erklärt werden, da dieses im in vitro-Versuchsansatz gleich ist. Die Plasmamembran ATPaseaktivität ist sehr stark vom Angebot monovalenter Kationen abhängig (Bowman et. al. 1981). Da sie bei K^+ doppelt so hoch wie bei Na^+ ist, könnte die Schwingung auf dem unterschiedlichen Ionenangebot im Extrakt beruhen. Da die Synthese der PM-ATPase nicht rhythmisch erfolgt (Rensing et. al., in Vorbereitung), muß eher eine rhythmische Regulation oder ionenabhängige Synthese dieses Enzyms angenommen werden. Demgegenüber ist das ATP/ADP-Verhältnis bzw. der Energycharge an den circadianen Oszillator gekoppelt und folgt etwa der unterschiedlichen circadianen Periodenlänge der untersuchten Stämme. Die Maxima für den Energycharge und die Phasenverfrühung der mitochondrialen Inhibitoren findet man in der gleichen circadianen Tagphase. Die geringe ATPaseaktivität in dieser Phase weist auf einen Antagonismus von mitochondrialer ATPsynthese in der Tagphase und cytoplasmatischem ATPverbrauch in der Nachtphase hin.

4.3.2. Vergleich mit ^{31}P -NMR-Spektren und Literaturbefunden

^{31}P NMR ist eine gut geeignete Methode, um den Energiestoffwechsel lebender Organismen zu untersuchen (Ugurbil et. al. 1979). Zur Untersuchung der circadianen Rhythmik wurde diese Methode bisher nicht verwendet. Neurospora-Mycelien in Flüssigkultur des Wildtyps bdA und der Mutanten frq 1 A und frq 7 A liefern NMR-Spektren mit deutlich ausgebildeten Signalen für anorganisches Phosphat, ATP + ADP, NAD + NADP und mobiles Polyphosphat (Schulz, Pilatus 1983). Unter den zur Untersuchung der circadianen Rhythmik gewählten Standardminimalbedingungen nimmt in allen drei Stämmen zuerst die Polyphosphatkonzentration und dann das ATP und das anorganische Phosphat ab. Das Verschwinden des Phosphats läßt sich durch den Einbau in nichtmobile Phosphatfestkör-

per erklären (Urech et. al. 1978, Jacobson et. al. 1982). Aufgrund des geringen Kohlenstoffangebots kann eine erneute Rückführung des Phosphats in den zellulären Stoffwechsel nicht erfolgen. Nach Überführung der Kulturen in Minimalbedingungen mit 0.03 % Glucose und Dauerdunkel findet eine vorübergehende Stimulierung des Energiestoffwechsels statt, wobei etwa 10 Stunden nach dem Hell-Dunkel-Wechsel in allen Stämmen unabhängig von der Periodenlänge das ATP-Maximum erreicht wird. Die dann folgende Abnahme aller Metabolite kann bis ca. 24 Stunden nach dem Hell-Dunkel-Wechsel verfolgt werden. Dieser Meßzeitraum ist zu kurz, um ein vollständiges Bild über mögliche Unterschiede zwischen den Rhythmusmutanten zu bekommen. Bei Verwendung der kurzperiodischen Mutante frq 1 A mit einer Periodenlänge von 16.5 Stunden gibt es Hinweise für einen erneuten Wiederanstieg des ATP und der Glucosephosphate nach einem der Periodenlänge entsprechenden Zeitintervall. Sargent (unveröffentlicht) hat gefunden, daß der circadiane Rhythmus der CO₂-Produktion (Woodward, Sargent 1973) in frq 1 A der verkürzten Periodenlänge dieses Stammes entspricht. Die genaue Phasenlage der genannten rhythmischen Parameter zueinander ist nicht bekannt. Die höchsten Glucosephosphat- und CO₂-Gehalte werden in der subjektiven Nachtphase, die höchsten ATP-Gehalte dagegen in der subjektiven Tagphase gefunden. Abweichungen von den gewählten Standardkulturbedingungen durch ein erhöhtes Glucoseangebot haben erneutes Wachstum und Differenzierung zur Folge. Die Identifizierung rhythmischer Parameter wird damit erschwert oder sogar verhindert. Die Unterschiede der ATP-Gehalte zu verschiedenen Zeitpunkten in den 3 Stämmen war überlagert durch eine kontinuierliche Abnahme des ATP-Gehaltes. Die gleiche Beobachtung hat auch Nakashima (1981) für die CO₂-Produktion in Flüssigkultur gemacht und daher postuliert, daß der Energiestoffwechsel nicht durch den circadianen Oszillator kontrolliert werde. Glucosepulse führten dabei zu einer sofortigen CO₂-Erhöhung. NMR-Spektren nach Glucosepulsen zeigen hohe Zuckerphosphatpeaks. Glucosepulse hoher Konzentration verursachen andererseits keine Phasenverschiebungen des circadianen Oszillators und führen innerhalb von 5 Minuten zu einer Abnahme des ATPs, was auf die Phosphorylierung zu den Zuckerphosphaten zurückzuführen sein könnte.

Diese signifikanten Konzentrationsänderungen treten in verschiedenen Kompartimenten auf (ATPSynthese und CO_2 -Produktion über den Krebszyklus in den Mitochondrien, ATPverbrauch und Glucosephosphate im Cytoplasma). Circadiane Rhythmen von Metaboliten in diesen Kompartimenten, die gegeneinander phasenverschoben sind, können sich daher in Abhängigkeit vom energetischen Zustand der Zelle aufheben oder verstärken. Die unterschiedliche Wirkung von DCCD auf den circadianen Oszillator im Wildtyp und poky (u.a. reduzierter ATP-Spiegel) liefert hierfür genauso Hinweise wie der hemmende Einfluß von Calcium auf die phasenverschiebende Wirkung des Ionophors A23187 und dessen Wechselwirkung mit Antimycin A (Nakashima 1984). Antimycin A allein induziert trotz 85 %iger Reduzierung des ATP-Spiegels nur geringe Phasenverschiebungen (Nakashima 1984). Das normale Funktionieren des circadianen Oszillators kann daher nicht allein von der absoluten Konzentration bestimmter Metabolite abhängig sein. Entsprechend kann aus einer fehlenden Rhythmik des Energiestoffwechsels unter bestimmten energetischen Minimalbedingungen aber auch nicht auf die Unabhängigkeit vom circadianen Oszillator geschlossen werden.

4.3.3. Schlußfolgerungen

Die biochemischen Untersuchungen zeigen, daß die circadiane Rhythmik von absoluten Metabolitkonzentrationen unabhängig ist, da genetische Veränderungen des circadianen Oszillators keine Konzentrationsunterschiede und diese wiederum keine Veränderung der Rhythmik zur Folge haben. Beobachtbare Oszillationen lassen sich nicht auf nur einen molekularen Bestandteil des Energiestoffwechsels zurückführen. Die Annahme einer koordinierten Wechselwirkung verschiedener molekularer Komponenten ist daher eine brauchbare Arbeitshypothese.

Dabei könnte die Periode der Schwingung durch phasenspezifische An- bzw. Abkopplung der Kompartimente (Brody 1974) erklärt werden. Die unterschiedliche Amplitude der Schwingung könnte durch Transportvorgänge, die energieabhängige Gradienten voraussetzen,

zustandekommen. So ist der Phosphattransport in die Mitochondrien pH-abhängig, derjenige in die Vakuole aber möglicherweise nicht (Wohlrab et. al. 1982). Hierin könnte ein Grund für die unterschiedliche Bedeutung von Mitochondrien und Vakuole für die circadiane Rhythmik gefunden werden.

Die unterschiedliche Amplitude der ATPaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert auf Agar und in Flüssigkultur liefert ebenfalls Hinweise für diese Hypothese.

Die Untersuchung der Bedeutung von Ionen für die zeitliche Synthese, Regulation und Aktivität von Enzymen sowie deren Einfluß auf die Hemmwirkung bestimmter Inhibitoren läßt weitere Erkenntnisse über die Natur des circadianen Oszillators erwarten.

Da die Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen auf bestimmte Schlüsselenzyme wie die Plasmamembran ATPase und die mitochondriale ATPsynthetase konvergieren, wäre eine gezieltere Analyse der zeitlichen Synthese und Regulation dieser Komponenten in unterschiedlichen Ionenmilieus wünschenswert, die auch auf die RNA- und DNA-Ebene ausgedehnt werden sollte.

Die Abhängigkeit der Membranprotein-mRNA-Synthese von circadianen Änderungen der Ionenkonzentration wird auch in dem Modell von Burgoyne (1978) im Unterschied zu anderen Membranmodellen (Engelmann, Schrempf 1980) postuliert.

5. Modell

Pulse der Stoffwechsellinhibitoren Azid, Cyanid, NEM, Molybdat und Vanadat bewirken Phasenverschiebungen der circadianen Sporulationsrhythmik von Neurospora crassa, die denen des Protein-syntheseinhibitors CHX gleichen. Die vergleichbaren PRCs für Licht und DCCD zeigen dagegen einen umgekehrten Verlauf. In dem Modell wird der gleiche molekulare Prozeß der Protonentranslokation durch die Hemmstoffe in entgegengesetzter Richtung gestört, was dann zu zwei Typen von PRCs führt (Drescher et. al. 1982).

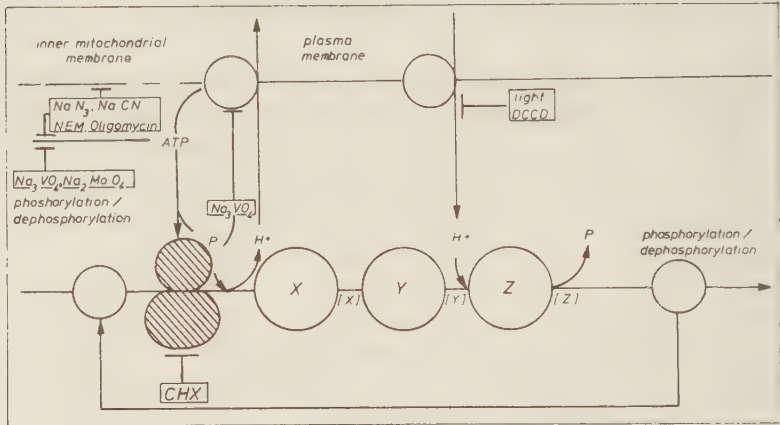


Abb. 18 Modell (verändert nach Drescher et. al. 1982) der Rückkopplung von Translationkontrolle, Phosphorylierung und Ionentransport.
X: Konzentration Enzym oder Transportprotein,
Y: Produktkonzentration,
Z: Aktivität Proteinkinase.

Die mitochondriale Mutante poky mit einem verringerten ATP-Gehalt reagiert auf CHX wie der Wildtyp - auf Licht und DCCD dagegen nicht. Störungen in einem Teil des Systems führen daher nicht

immer zu Veränderungen des Gesamtsystems. Entweder steuert ein Hauptoszillator der Translationskontrolle über Zwischenglieder einen ATP-abhängigen Nebenoszillator (rhythmische aktive Ionen-translokation) oder pulsformige Störungen der ATP-Produktion durch Stoffwechselinhibitoren wirken auf diesen Hauptoszillator - eine dauerhafte Erniedrigung des ATP-Spiegels (Hungerbedingungen, poky) dagegen nicht. Die Reaktion des Hauptoszillators auf Licht und DCCD erfolgt nach diesem Modell über eine Stimulierung der Proteinkinase als Zwischenglied, das als Repressor auf die Translationskontrolle zurückwirkt. Bei dieser Kontrolle könnte Proteinphosphorylierung/-dephosphorylierung beteiligt sein. Die Temperaturempfindlichkeit der Licht- und DCCD-PRCs und die Reaktion auf Hitzeschock würden danach zu einer Hemmung der Proteinsynthese über eine Hemmung der Phosphorylierung führen.

Die Untersuchung der Translationsrate in Abhängigkeit von Temperatur und Protonenkonzentration (pH) einerseits und unter Verwendung spezifischer Mutanten und Hemmstoffe andererseits ermöglicht weitere Einsichten in die Wechselwirkung von Translation, Phosphorylierung und Ionentransport.

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung tagesperiodischer Veränderungen des Energiestoffwechsels von Neurospora crassa für den Wirkungsmechanismus der circadianen Rhythmik untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden Mutanten mit unterschiedlichen Periodenlängen der circadianen Sporulationsrhythmik (frq) und mitochondriale Mutanten mit u.a. Defekten im Elektronentransport (poky) und der ATPsynthetase (C93) verwendet.

Die Experimente wurden auf drei verschiedenen Untersuchungsebenen durchgeführt:

1. Der Wirkung von Störpulsen mit Stoffwechselinhibitoren auf die Phasenlage der circadianen Sporulationsrhythmik.
2. Der Wirkung dieser Störpulse auf die Metabolite des Energiestoffwechsels sowie die zeitlichen Konzentrationsänderungen dieser Metabolite in vivo.
3. Der Messung zeitlicher Veränderungen des Energycharge und der ATPase-Aktivität in vitro.

Folgende Methoden wurden eingesetzt: ein Computerprogramm zur Registrierung von Periodenlänge und Phasenlage der räumlich fixierten circadianen Sporulationsrhythmik, ^{31}P NMR-Spektroskopie für die in vivo Untersuchungen, Biolumineszenzphotometrie für die Bestimmung der Adeninnucleotidgehalte und zwei Enzymtests für die Messung der ATPase-Aktivität.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die circadiane Rhythmik der Sporenbildung von Neurospora crassa durch Stoffwechselinhibitoren wie Vanadat (Na_3VO_4), Molybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), N-Ethylmaleimid (NEM), Azid (NaN_3), Cyanid (NaCN) und Oligomycin phasenverschoben werden kann. Die Phasen-Response-Kurven dieser Hemmstoffe haben einen ähnlichen Verlauf wie die des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX). Da die mitochondriale Mutante poky auf CHX genauso reagiert wie der Wildtyp bd A und die circadiane Periodenlänge unverändert ist, sind die Mitochondrien unbedeutend für die circadiane Rhythmik.

Der Kurvenverlauf der Phasen-Response-Kurven für Licht und DCCD ist im Wildtyp bd A und in der mitochondrialen Mutante poky im Vergleich zu den obigen Hemmstoffen entgegengesetzt, wobei die Amplitude der Schwingung in poky deutlich verringert ist. Diese geringere Lichtempfindlichkeit von poky könnte auf der veränderten Zusammensetzung der Plasmamembran dieser Mutante beruhen.

Die in vivo ^{31}P NMR Untersuchungen zeigen sowohl eine starke Abnahme der ATP-Konzentration für den Untersuchungszeitraum zur Aufnahme der Phasen-Response-Kurven als auch für einige untersuchte Stoffwechselinhibitoren (Azid, Cyanid, Molybdat), aber nicht für DCCD. Weder die vorübergehende Verringerung der ATP-Konzentration durch Störpulse noch deren dauerhafte Verringerung durch Hungerbedingungen oder Mutation (poky) sind daher Ursache der Phasenverschiebungen.

Die in vitro Untersuchungen zeigen, daß die circadiane Rhythmik des Energycharge phasenverschoben ist gegenüber der maximalen ATPase-Gesamtaktivität. Diese Enzymaktivität ist durch Vanadat, einen Hemmstoff der Plasmamembran-ATPase aber nicht durch Azid, einen Hemmstoff der mitochondrialen ATPase hemmbar, d.h. das Maximum der ATP-Produktion durch die oxidative Phosphorylierung ist phasenverschoben gegenüber dem ATP-Abbau durch die Plasmamembran-ATPase. In Frequenzmutanten ändert sich die Periodenlänge des ATP/ADP-Verhältnisses etwa synchron mit der Periodenlänge der circadianen Rhythmik der Sporenbildung.

Die Ergebnisse zeigen, daß der circadiane Oszillator empfindlich gegenüber Störungen des Energiestoffwechsels ist. Da jedoch hungerinduzierte Veränderungen der ATP-Konzentration keine Rhythmusänderung nach sich ziehen und Mutanten mit verschiedenen Periodenlängen (frq1, frq7, Wildtyp bd) etwa die gleichen ATP-Konzentrationen aufweisen, scheint die ATP-Konzentration selbst für den Mechanismus der Schwingung keine Bedeutung zu haben. Die nachgewiesenen rhythmischen Veränderungen des ATP-Gehalts sind daher wahrscheinlich sekundäre, an die circadiane "Uhr" angekoppelte, Funktionen.

Literaturverzeichnis

- ALBERGHINA, L., STURANI, E. (1981):
Control of growth and the nuclear division cycle in
Neurospora crassa
Microbiological Reviews 45, 99 - 122
- ATKINSON, D. E. (1968):
The energy charge of the adenylate pool as a regulatory
parameter. Interaction with feedback modifiers
Biochemistry 7, 4030 - 4034
- ATKINSON, D. E. (1977):
Cellular energy metabolism and its regulation
Academic Press
- BALKE, N. E., HODGES, T. K. (1979):
Comparison of reduction in ATP content, plasma-membrane-
associated ATPase activity, and potassium absorption in
oat roots by DES
Plant Physiol 63, 53 - 56
- BORST-PAUWELS, G.W.F.H., PETERS, P.H.J. (1981):
Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane
ATPase by vanadate
Biochimica et Biophysica Acta 642, 173 - 181
- BOWMAN, B.J., MAINZER, S.F., ALLEN, K.E., and SLAYMAN, C.W. (1978):
Effects of inhibitors on the plasma membrane and mito-
chondrial adenosine triphosphatases of Neurospora crassa
Biochim. Biophys. Acta 512, 13 - 28
- BOWMAN, E.J., BOWMAN, B.J., and SLAYMAN, C.W. (1981):
Isolation and characterization of plasma membranes from
wild type Neurospora crassa
The Journal of Biological Chemistry 256, 12336 - 12342
- BOWMAN, B.J., BLASCO, F., and SLAYMAN, C.W. (1981):
Purification and characterization of the plasma membrane
ATPase of Neurospora crassa
The Journal of Biological Chemistry 256, 12343 - 12349
- BOWMAN, B. J. (1983):
Vanadate uptake in Neurospora crassa occurs via phosphate
transport system II
Journal of Bacteriology 153, 286 - 291
- BOWMAN, B.J., ALLEN, K.E., and SLAYMAN, C.W. (1983):
Vanadate-resistant mutants of Neurospora crassa are
deficient in a high-affinity phosphate transport system
Journal of Bacteriology 153, 292 - 296
- BOWMAN, E. J. (1983):
Comparison of the vacuolar ATPase of Neurospora crassa
with the mitochondrial and plasma membrane ATPases
The Journal of Biological Chemistry 258, 15238 - 15244

- BRAIN, R., WOODWARD, D.O., and BRIGGS, R. (1977):
Correlative studies of light sensitivity and cytochrome
content in Neurospora crassa
Carnegie Inst. Wash. Yearbook 1976, 295 - 299
- BRODY, S. (1974):
Mitochondrial uncoupling and circadian biochemical
oscillations in Neurospora
Fed. Proc. 33, 1271 (Abstract)
- BÜNNING, E., KURRAS, S. und VIELHABEN, V. (1965):
Phasenverschiebungen der endogenen Tagesrhythmik durch
Reduktion der Atmung
Planta 64, 291 - 300
- BÜNNING, E., and MOSER, I. (1972):
Influence of valinomycin on circadian leaf movements
of Phaseolus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2732 - 2733
- BÜNNING, E. (1977):
Die physiologische Uhr, 4. Auflage
Springer-Verlag, New York, Heidelberg
- BURGOYNE, R. D. (1978):
A model for the molecular basis of circadian rhythms
involving monovalent ion-mediated translational control
FEBS Lett. 94, 17 - 19
- BYINGTON, K.H., SMOLEY, J.M., MORE, a.V., and GREEN, P.E. (1968):
On the fragmentation of mitochondria by diethylstilbestol
Arch. Biochim. Biophys. 128, 762 - 773
- CHOATA, G.L., and MANSOUR, T.E. (1978):
Inhibition of sheep heart phosphofructokinase by
orthovanadate
Fed. Proc. 37, 1433
- COCUCCI, M., BALLARIN-DENTI, A., MARRE, M.T. (1980):
Efforts of orthovanadate on H^+ -secretion, K^+ -uptake,
electric potential difference and membrane ATPase acti-
vities of higher plant tissues
Plant Science Letters 17, 391 - 400
- COLLINS, R.A., BERTRAND, H., LA POLLA, R.J., and LAMBOWITZ, A.M. (1981)
A novel extranuclear mutant of Neurospora with a tempera-
ture-sensitive defect in mitochondrial protein synthesis
and mitochondrial ATPase
Mol. Gen. Genet. 181, 13 - 19
- CORNELIUS, G., and RENSING, L. (1982):
Can phase response curves of various treatment of circa-
dian rhythms be explained by effects on protein synthesis
and degradation?
Bio Systems 15, 35 - 47

- DAVIS, R.H., and DE SERRES, F. (1970):
Genetic and microbiological research techniques for
Neurospora crassa
Methods. Enzymol. 17, 79 - 143
- DELMER, D.P., and BRODY, S. (1973):
Periodic changes in the energy charge state of a circadian rhythm mutant of Neurospora crassa
Abst. Ann. Mtg., Amer. Soc. Microbiol., 38
- DELMER, D.P., and BRODY, S. (1974):
Circadian rhythms in Neurospora crassa: Oscillation in the level of an adenine nucleotide
J. Bacteriol. 121, 548 - 553
- DE MASTER, E.G., MITCHELL, R.A. (1973):
A comparison of arsenate and vanadate as inhibitors or uncouplers of mitochondrial and glycolytic energy metabolism
Biochemistry 12, 3616 - 3621
- DHARMANANDA, S., and FELDMAN, J. (1979):
Spatial distribution of circadian clock phase in aging cultures of Neurospora crassa
Plant Physiol. 63, 1049 - 1054
- DIECKMANN, C. (1980):
Circadian rhythms in Neurospora crassa: a biochemical and genetic study of the involvement of mitochondrial metabolism in periodicity
Ph. D. Thesis, Univ. of Calif., San Diego
- DIECKMANN, C., and BRODY, S. (1980):
Circadian rhythms in Neurospora crassa: oligomycin-resistant mutations affect periodicity
Science 207, 896 - 898
- DRESCHER, K., CORNELIUS, G., RENSING, L. (1982):
Phase response curves obtained by perturbing different variables of a 24 hr model oscillator based on translational control
J. theor. Biol. 94, 345 - 353
- ECKHARDT, D. (1982):
Einfluß von Vanadat auf die Blütenblattbewegung und auf die Aktivität isolierter ATPasen bei Kalanchoe blossfeldiana
Dissertation, Univ. Tübingen
- EDWARDS, D. C., and UNGER, B. W. (1978):
Nuclear mutations conferring oligomycin resistance in Neurospora crassa
J. Biol. Chem. 253, 4254 - 4258

- ENGELMANN, W., and SCHREMPF, M. (1980):
Membrane models of circadian rhythms
Photochem. and Photobiol. Rev. 5, 49 - 86
- ESKIN, A., and CORRENT, G. (1977):
Effects of divalent cations and metabolic poisons on
the circadian rhythm from the Aplysia eye
J. Comp. Physiol. 117, 1 - 21
- ESKIN, A., CORRENT, G., LIN, C.Y., MCADOO, D.J. (1982):
Mechanism for shifting the phase of a circadian rhythm
by serotonin: Involvement of cAMP
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 660 - 664
- FELDMAN, J.F., and HOYLE, M.N. (1973):
Isolation of circadian clock mutants of Neurospora
crassa
Genetics 75, 605 - 613
- FELDMAN, J.F., GARDNER, G.F., and DENISON, R.A. (1979):
Genetic analysis of the circadian clock of Neurospora
In: Biological Rhythms and their central mechanisms
(M. Suda et. al., eds.). North-Holland/Elsevier Bio-
medical Press, Amsterdam, 57 - 66
- FELDMAN, J.F., and DUNLAP, J. (1983):
Neurospora crassa: A unique system for studying circa-
dian rhythms
Photochem. Photobiol. Rev. 7, 319 - 368
- FERNANDEZ, M.P., GASCON, S., and SCHWENCKE, J. (1981):
Some enzymatic properties of vacuolar alkaline phosphatase from yeast
Curr. Microbiol. 6, 121 - 126
- GARDNER, G.F., and FELDMAN, J.F. (1980):
The frq locus of Neurospora crassa: a key element in
circadian clock organization.
Genetics 96, 877 - 886
- GILLIES, R.J., UGURBIL, K., DEN HOLLANDAR, J.A., and SHULMAN, R.G. (1981):
31-P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of Saccharomyces cerevisiae
Proc. Nat. Acad. Sci. 78, 2125 - 2129
- GILLHAM, N.C. (1978):
Organelle Heredity
Raven Press
- GLOVER, C.V.C. (1982):
Heat shock induced rapid dephosphorylation of a ribosomal protein in Drosophila
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 1781 - 1785

- GORDON, J., NIELSEN, P.J., MANCHESTER, K.L., TOWBIN, H.,
JIMENEZ DE ASUA, L., THOMAS, G. (1982):
Criteria for establishment of the biological significance of ribosomal protein phosphorylation
Current Topics in Cellular Regulation 21, 89 - 99
- HOCHBERG, M.L., and SARGENT, M.L. (1974):
Rhythms of enzyme activity associated with circadian conidiation in Neurospora crassa
J. Bacteriol. 120, 1164 - 1175
- JAGUS, R. CROUCH, D., KONIECZNY, A., SAFER, B. (1982):
The role of phosphorylation in the regulation of eukaryotic initiation factor 2 activity
Current Topics in Cellular Regulation 21, 35 - 63
- JACOBSON, L., HALMANN, M., and YARIV, J. (1982):
The molecular composition of the volutin granule of yeast
Biochemical Journal 201, 473 - 479
- JOHNSON, C.H. (1983):
Changes in intracellular pH are not correlated with the circadian rhythm of Neurospora
Plant Physiol. 72, 129 - 133
- KAKINUMA, Y., OHSUMI, Y., and ANRAKU, Y. (1981):
Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae
J. Biol. Chem. 256, 10859 - 10863
- KRUSE, M., RENSING, L.
unveröffentlicht
- LAMBOWITZ, A.M., CHUA, N.H., and LUCK, D.J.L. (1976):
Mitochondrial ribosome assembly in Neurospora: Preparation of mit ribosomal precursor particles, site of synthesis of mit ribosomal proteins and studies on the poky mutant
J. Mol. Biol. 107, 223 - 253
- LEIGH, R.A., WALKER, R.R. (1980):
ATPases and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (Beta vulgaris)
Planta 150, 222 - 229
- LEGERTON, T.L., KANAMORI, K., WEISS, R.L., ROBERTS, J.D. (1983):
Measurements of cytoplasmic and vacuolar pH in Neurospora using nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy
Biochemistry 22, 899 - 903
- LINNETT, P.E., and BEECHEY, R.B. (1979):
Inhibitors of the ATP Synthetase System
Methods Enzymol. 55, 472 - 518

- LOPEZ, V., STEVEN, T., and LINDQUIST, R.N. (1976):
Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase - catalysed phosphate ester hydrolysis
Archs. Biochem. Biophys. 175, 31 - 38
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDELL, R.J. (1951):
Protein measurements with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
- MARIN, B., and BLASCO, F. (1982):
Further evidence for the proton pumping work of tonoplast ATPase from Herea latex vacuole
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 354 - 361
- MATTERN, D.L., FORMAN, L.R., and BRODY, S. (1982):
Circadian rhythms in Neurospora crassa: A mutation affecting temperature compensation
Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 825 - 829
- MAYER, W.-E. (1981):
Energy-dependent phases of the circadian clock and the clock-controlled leaf movement in Phaseolus coccineus C.
Planta 152, 292 - 301
- MITCHELL, M.B., and MITCHELL, H.K. (1952):
A case of "maternal" inheritance in Neurospora crassa
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 442 - 449
- NAKASHIMA, H. (1981):
A liquid culture method for the biochemical analysis of the circadian clock of Neurospora crassa
Plant and Cell Physiol. 22, 231 - 238
- NAKASHIMA, H. (1982):
Effects of membrane ATPase inhibitors on light-induced phase shifting of the circadian clock in Neurospora crassa
Plant Physiol. 69, 619 - 623
- NAKASHIMA, H. (1982):
Phase shifting of the circadian clock by diethylstilbestrol and related compounds in Neurospora crassa
Plant Physiol. 70, 982 - 986
- NAKASHIMA, H. (1984):
Calcium inhibits phase shifting of the circadian conidiation rhythm of Neurospora crassa by the calcium ionophore A 23 187
Plant Physiol. 74, 268 - 271
- NAKASHIMA, H., and FELDMAN, J.F. (1980):
Temperature sensitivity of light-induced phase shifting of the circadian clock of Neurospora
Photochem. Photobiol. 32, 247 - 252
- NAKASHIMA, H., PERLMAN, J., and FELDMAN, J.F. (1981a):
Cycloheximide-induced phase shifting of the circadian clock of Neurospora
Amer. J. Physiol. 241, R31-R35

- NASSAR, F.R., and HÖFER, M. (1982):
Anaerobic active transport of D-Glucose analogues in
Schizosaccharomyces pombe (972h)
Hoppe Seyler's J. Physiol. Chem. 363, 902
- NICOLAY, K., SCHEFFERS, W.A., BRUINENBERG, P.M., and KAPTEIN, R.
(1982):
Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance studies of
intracellular pH, phosphate compartmentation and phos-
phate transport in yeasts
Arch. Microbiol. 133, 83 - 89
- NICOLAY, K., SCHEFFERS, W.A., BRUINENBERG, P.M., and KAPTEIN, R.
(1983):
In vivo ³¹P NMR studies on the role of the vacuole in
phosphate metabolism in yeasts
Arch. Microbiol. 134, 270 - 275
- PERKINS, D.D., and BARRY, E.G. (1977):
The cytogenetics of Neurospora
Adv. Genet. 19, 133 - 285
- PERLMAN, J., NAKASHIMA, H., and FELDMAN, J.F. (1981):
Assay and characteristics of circadian rhythmicity in
liquid cultures of Neurospora crassa
Plant Physiol. 67, 404 - 407
- RACKER, E. (1970):
Function and structure of the inner membrane of mito-
chondria and chloroplasts.
In: Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, edited
by E. Racker, 127 - 171
Van Nostrand Reinhold, New York
- RENSING, L. und SCHULZ, R. (1984):
Wie funktioniert die innere Uhr? Ansätze zur Aufklärung
des molekularen Mechanismus der circadianen Rhythmik
Biologie in unserer Zeit 14, 13 - 19
- RENSING, L., KRÖGER, J., DUNLAP, J.
(im Druck)
- REYNAFARJE, B., and LEHNINGER, A.L. (1978):
The K⁺/Site and H⁺/Site Stoichiometry of mitochondrial
electron transport
The Journal of Biological Chemistry 253, 6331 - 6334
- SAXE, H., RAJAGOPAL, R. (1981):
Effects of vanadat on bean leaf movement, stomatal
conductance, barley leaf unrolling, respiration and
phosphatase activity
Plant Physiol. 68, 880 - 884
- SANDERS, P., HANSEN, U.-P., SLAYMAN, C. (1981):
Role of plasma membrane proton pump in pH regulation
in non-animal cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5903 - 5907

- SANDERS, D., and SLAYMAN, C.L. (1982):
Control of intracellular pH
J. gen. Physiol. 80, 377 - 402
- SARGENT, M.L., BRIGGS, W.R., and WOODWARD, D.O. (1966):
The circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of Neurospora crassa
Plant Physiol. 41, 1343 - 1349
- SCHULZ, R., FELDMAN, J.F., and RENSING, L. (1982):
Evidence for the involvement of energy metabolism within the circadian clock mechanism of Neurospora crassa
Hoppe-Seyler's J. Physiol. Chem. 363, 957
- SCHULZ, R., and PILATUS, U. (1983):
³¹P-NMR Studies of wild-type and circadian clock mutants of Neurospora crassa
Hoppe-Seyler's J. Physiol. Chem. 364, 1214 - 1215
- SCHULZ, R., and RENSING, L.:
Energy metabolism and circadian clock function in wild type and the mitochondrial mutant "poky" of Neurospora crassa
(im Druck)
- SCHULZ, R., PILATUS, U.:
Energy metabolism and circadian clock function in wild type and frq mutants of Neurospora crassa. NMR and biochemical studies
(in Vorbereitung)
- SEBALD, W., MACHLEIDT, M., and WACHTER, E. (1980):
N'-N-dicyclohexyl carbodiimide binds specifically to a single glutamyl residue of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosinetriphosphatases of Neurospora crassa and Saccharomyces cerevisiae
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 785 - 789
- SCHREMPF, M. (1980):
The action of abscisic acid on the circadian petal movement of Kalanchoe blossfeldiana
Zeitschrift f. Pflanzenphysiol. 100, 397 - 407
- SELETRENNIKOFF, C., NELSON, R.E., and SIEGEL, R.W. (1974):
Phase-specific genes for macroconidiation in Neurospora crassa
Genetics 78, 679 - 690
- SIMONS, T.J.B. (1979)
Vanadate - a new tool for biologists
Nature 281, 337 - 338
- SLAYMAN, C.L., LONG, W.S., LU, C.Y.-H. (1973):
The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of Neurospora crassa
J. Membrane Biol. 14, 305 - 338

- SLAYMAN, C.W., and SLAYMAN, C.L. (1975):
Energy coupling in the plasma membrane of Neurospora:
ATP-dependent proton transport and proton-dependent
sugar cotransport
In: Molecular aspects of membrane phenomena
(H.R. Kaback et. al., eds.)
Springer
- STEINHEIL, W. (1969):
Versuche zur Abhängigkeit der circadianen Rhythmik von
der Atmungskettenenergie bei Kalanchoe blossfeldiana
Z. Pflanzenphysiol. 62, 204 - 215
- TRACHSEL, H., RANU, R.S., LONDON, I.M. (1978):
Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte
lysates: Purification and characterization of heme-
reversible translational inhibitor
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3654 - 3658
- UGURBIL, K., SHULMAN, R.G., BROWN, T.R. (1979):
High-resolution ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance
studies of Escherichia coli cells in vivo
In: Biological applications of magnetic resonance
(Shulman, R.G., ed.) Academic Press, New York, 537 - 589
- URECH, K., DÜRR, M., BOLLER, Th., WIEMHON, A., and SCHWENCKE, J.
(1978):
Localization of polyphosphate in vacuoles of Saccharo-
myces cerevisiae
Arch. Microbiol. 116, 275 - 278
- VERLOURS, J., LARAT, A., GUERIN, M., GUERIN, B. (1975):
Vanadate inhibition of mitochondrial succinate dehydro-
genase and dicarboxylate carrier
Biochimie 57, 975 - 978
- WAGNER, E., TETZNER, J., HAERTLE, V., and DEITZER, G.F. (1974):
Endogenous rhythmicity and energy transduction VIII.
Kinetics in enzyme activity, redox state and energy
charge as related to photomorphogenesis in seedlings
of Chenopodium rubrum L.
Ber. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 87, 291 - 302
- WAGNER, E. (1976):
Endogenous rhythmicity in energy metabolism: basis for
timer-photoreceptor interactions in photoperiodic con-
trol
In: The Molecular Basis of Circadian Rhythms (J.W.
Hastings and H.G. Schweiger, eds.), 215 - 238
Dahlem Konferenzen, Abakon Verlagsgesellschaft, Berlin
- WOHLRAB, H., and FLOWERS, N. (1982):
pH-Gradient dependent phosphate transport
catalyzed by the purified mitochondrial
phosphate transport protein
J. Biol. Chem. 257: 28-31
- WOODWARD, D.O., and SARGENT, M.L. (1973):
Circadian rhythms in Neurospora
In: Behaviour of Microorganisms (A. Perez-Miravete, ed.)
Plenum Press, N.Y., 282 - 296

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Rensing für die Themenstellung und die ständige Betreuung der Arbeit.

Ulrich Pilatus danke ich für die gemeinsame Durchführung und Prof. Dr. Leibfritz für die Ermöglichung der NMR-Untersuchungen. Ein Teil der Experimente wurde in den Labors von Prof. J. F. Feldman und Prof. S. Brody begonnen. Dr. W. Taylor und Dr. J. Dunlap führten mich in neue Arbeitstechniken ein. Alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Rensing unterstützten mich bei der Arbeit im Labor.

Allen genannten Personen sei an dieser Stelle herzlich für ihre Hilfe gedankt.



Salvador Dalí. *The Persistence of Memory*. 1931. New York, Museum of Modern Art

Ist für uns die Welt nicht nur ein Zusammenfassen von Relationen unter einem Maße? Sobald dies willkürliche Maß fehlt, zerfließt unsere Welt!

F. Nietzsche 1881/82

